

Aus dem Institut  
für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik  
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Entwicklung von DNAsen gegen  
Humane Rhinoviren:  
Design und *in vitro* Testung**

Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Sebastian David Unger aus Marburg  
Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 21.12.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. rer. nat. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. med. Harald Renz

1. Korreferent: Frau Prof. Dr. Andrea Maisner

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Asthma bronchiale.....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Klinisches Bild .....	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.4	Die Bedeutung von humanen Rhinoviren für Asthma bronchiale .....	5
1.1.5	Aktueller Stand der Asthmatherapie .....	7
1.2	Die Krankheitserreger humane Rhinoviren.....	9
1.2.1	Systematik .....	9
1.2.2	Aufbau.....	11
1.2.3	Lebenszyklus.....	12
1.2.4	Prävention und Therapieansätze.....	13
1.3	Antisense-basierte Strategien .....	13
1.3.1	RNA-Interferenz durch small interfering RNA.....	14
1.3.2	Antisense-Oligonukleotide.....	15
1.3.3	Ribozyme .....	16
1.3.4	DNAzyme.....	16
1.4	Arbeitshypothesen und Zielsetzung des Projekts .....	19
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Oligonukleotide.....	23
2.1.2	Verwendete RNA Fragmente .....	30
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Arbeit <i>in silico</i> .....	33
2.2.1.1	DNAzym-Design .....	33
2.2.1.2	Erstellung der Virusgenom-Datenbank.....	34
2.2.1.3	Analyse der Virusgenomsequenzen.....	38
2.2.2	Experimente <i>in vitro</i> .....	38

2.2.2.1	Vorbereitung - Plasmid-Konstruktion.....	38
2.2.2.2	RNA-Herstellung aus Plasmiden .....	39
2.2.2.2.1	Plasmid-Linearisierung.....	39
2.2.2.2.2	DNA-Fällung .....	40
2.2.2.2.3	Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung .....	40
2.2.2.2.4	<i>In vitro</i> Transkription.....	40
2.2.2.2.5	Aufreinigung von RNA .....	40
2.2.2.3	Konzentrationsmessung von Nukleinsäure-Lösungen.....	41
2.2.2.4	DNA-Agarose-Gel .....	41
2.2.2.5	RNA-Agarose-Gel Herstellung.....	42
2.2.2.6	Testung der katalytischen Aktivität der DNAzyme <i>in vitro</i> .....	42
2.2.2.6.1	Qualitative Testung.....	42
2.2.2.6.2	Quantitative Testung.....	44
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>47</b>
3.1	<i>In vitro</i> Screening der Testregionen .....	47
3.1.1	Phänomen einer zusätzlichen Bande bei Versuchen mit HRV-16 5'-UTR RNA Fragment .....	57
3.2	Analyse der gefundenen Schnittstellen <i>in silico</i> .....	58
3.2.1	Testung von neuen DNAzymen .....	60
3.3	Suche nach Lösungsmöglichkeiten .....	61
3.3.1	Kreuz-Aktivität von starken DNAzymen.....	61
3.3.2	Testung von Längenvarianten .....	65
3.3.2.1	Längenvariation von Dua-01 .....	66
3.3.2.2	Längenvariation von Dua-02 .....	68
3.3.2.3	Längenvariation von Dua-03 .....	69
3.3.2.4	Effekte der isolierten Aufspaltung der Stamm-Schlaufen Subdomäne .....	71
3.4	Weitere Optimierung der gefundenen DNAzyme .....	72
3.4.1	Qualitative Analyse weiterer Längenvarianten .....	72
3.4.1.1	Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 3 .....	72

3.4.1.2	Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 4 .....	74
3.4.1.3	Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 5 .....	75
3.4.1.4	Schlussfolgerungen .....	77
3.4.2	Quantitative Analyse möglicher Längenvarianten .....	77
3.4.2.1	Quantitative Testung an Schnittstelle 3 .....	78
3.4.2.2	Quantitative Testung an Schnittstelle 4 .....	79
3.4.2.3	Quantitative Testung an Schnittstelle 5 .....	81
3.4.2.4	Selektionsergebnis .....	82
3.5	Abschließende Untersuchungen .....	83
3.5.1	Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	83
3.5.2	Temperaturabhängigkeit.....	84
3.5.3	DNAzym-Modifikation.....	85
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>87</b>
4.1	Vorgehensweise und Schwierigkeiten bei der Entwicklung erfolgreicher DNAzyme.....	89
4.2	Fazit und Ausblick.....	97
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>127</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>128</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>129</b>
12.1	Ergebnisanhang .....	129
12.1.1	Detaillierte Ergebnisse der <i>in silico</i> Analyse.....	129
12.1.2	Spaltungsprüfungen von quantitativen Analysen.....	140
12.1.2.1	Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 3.....	140
12.1.2.2	Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 4.....	143

12.1.2.3	Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 5.....	146
12.1.2.4	Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	149
12.1.3	Aussagekraft der quantitativen Ergebnisse .....	150
12.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	151
12.3	Danksagung .....	153

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Asthma bronchiale**

Asthma bronchiale ist eine heterogene Erkrankung, die für gewöhnlich durch eine chronische Entzündung der Atemwege und bronchiale Hyperreagibilität charakterisiert ist und durch – in Zeit und Intensität variable – respiratorische Symptome wie Giemen, Atemnot, Brustenge und Husten bei wechselnder Atemwegsobstruktion mit vermindertem Atemfluss definiert wird (Global Initiative for Asthma 2017).

### **1.1.1 Epidemiologie**

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnte weltweit ein Anstieg der Prävalenz asthmatischer Erkrankungen beobachtet werden (Eder et al. 2006). Momentan sind schätzungsweise 300 Millionen Menschen, nach anderen Quellen 4,5 Prozent der Weltbevölkerung, betroffen (Masoli et al. 2004; To et al. 2012). Zum jetzigen Zeitpunkt hat sich die Prävalenz in Deutschland bei 14 Prozent betroffener Kinder und 5-6 Prozent betroffener Erwachsener stabilisiert und ist seit Anfang der 1990er Jahre unverändert geblieben (Becker et al. 2012; Zöllner et al. 2005). Insgesamt scheint die Asthma-Prävalenz in Ländern mit hohen Erkrankungsraten ein Plateau erreicht zu haben, in Ländern mit seltenerem Auftreten aber an Bedeutung zu gewinnen und dadurch im Laufe der nächsten Jahre überall ähnlich hohe Werte zu erreichen (Pearce et al. 2007; Anderson et al. 2007b). Für diese Entwicklungen konnte bislang keine sichere Erklärung gefunden werden. Es wird ein Zusammenspiel von Veränderungen vieler verschiedener Faktoren, wie Essgewohnheiten, Wohnumständen, Hygienestandards, mikrobiellen Kontakten, Infektionen in der Kindheit und Kontakt mit Schadstoffen oder Allergenen aus der Umwelt diskutiert und untersucht (Zöllner et al. 2005). Mittels der hohen Prävalenz bedingt Asthma enorme sozioökonomische Kosten, insbesondere direkt durch Krankenhausaufenthalte und Medikation, jedoch auch indirekt durch krankheitsbedingte Produktivitätsausfälle (Bahadori et al. 2009).

### **1.1.2 Klinisches Bild**

Je nach Ausprägungsform der Erkrankung werden die typischen Symptome durch Anstrengung, Allergen- oder Reizstoff-Kontakt, Wetterveränderungen und/oder virale Atemwegsinfektionen hervorgerufen. Einem Anfall können verschiedene Prodromi wie vermehrter Juckreiz oder ein ungenaues Angstgefühl vorausgehen. Typisch im akuten Anfall sind Dyspnoe, Husten und Giemen bei Inspiration und Expiration. Oft verstärken sich die Symptome in der Nacht und sind morgens besonders stark. Bei leichten Formen, vor allem bei kleinen Kindern, liegt oft nur ein chronischer Husten

vor. Typisch für Asthma sind zudem zeitliche Schwankungen in der Schwere der Symptomatik und plötzliche Verschlechterungen, sogenannte Exazerbationen mit besonders starken Beschwerden. Dann kann die Atmung so schwerfallen, dass Angst entsteht, die Patienten vermehrt die Atemhilfsmuskulatur einsetzen müssen und Tachypnoe entwickeln. Sie produzieren vermehrt zähen Schleim und haben Probleme diesen abzu husten. Da die Obstruktion normalerweise vor allem die Ausatmung beeinträchtigt, kommt es bei schweren Asthmaanfällen oft zu einer Überblähung der Lungen. Als Maximalform kann bei einer starken Exazerbation ein Status asthmaticus auftreten. Diese Situation ist lebensbedrohlich, da die Obstruktion so stark ist, dass nicht mehr genug Sauerstoff aufgenommen werden kann und gleichzeitig die gewohnte Therapie nicht mehr anspricht (Becker et al. 2012; Global Initiative for Asthma 2017).

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Für die heterogene Erkrankung existiert keine einzelne spezifische Ursache, vielmehr wurden mit der Zeit immer mehr Faktoren identifiziert, die zur Krankheit beitragen und bei unterschiedlichen Ausprägungsformen in wechselseitigem Einfluss eine krankhafte Entwicklung begünstigen (Anderson 2008).

Die Unterschiede in zeitlicher Manifestation, Art des Krankheitsverlaufs und möglicher Beeinflussung durch Therapieformen haben zu einer Unterteilung in verschiedene Ausprägungsformen, sogenannte Phänotypen, geführt. Anfänglich wurde extrinsisches oder allergisches Asthma von intrinsischem Asthma unterschieden (Rackemann 1947). Mittlerweile ist die Unterteilung deutlich tiefgreifender und es werden eine Vielzahl von Phänotypen postuliert, unter anderem early onset asthma, adult-onset severe eosinophilic asthma, neutrophilic asthma oder virus-induced asthma (Koczulla et al. 2017; Wenzel 2012). Weiterführend wird versucht Endotypen, und damit eine Unterteilung anhand der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen und messbaren Biomarkern, zu etablieren. Eine grobe Abgrenzung anhand der vorliegenden Entzündungsreaktion kann dabei zwischen einer Typ 2-getriebenen Form, einer nicht Typ 2 Form (möglicherweise Th17-getrieben) sowie unklaren Mischformen gezogen werden (Agache und Akdis 2016).

Am meisten erforscht und verstanden ist die Pathogenese der Typ 2 Entzündungsform mittels allergischer Genese. Hier kommt es während der Sensibilisierung zum Erstkontakt mit einem Antigen, welches nach Eindringen in die Atemwegsschleimhaut von Antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, intrazellulär prozessiert und mit Hilfe von MHCII-Molekülen auf ihrer Oberfläche in regionären Lymphknoten präsentiert wird. Dies führt zum Erkennen des Antigens durch naive CD4+ T-Zellen mit deren T-Zell-Rezeptor (Lambrecht und Hammad 2010). Abhängig von der Menge der



präsentierten Antigene, dem vorliegenden Zytokinmilieu und der Affinität des Allergens zum MHCII-Molekül kommt es über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA3 zu einer Differenzierung der naiven T-Zelle in Richtung einer Th2-Zelle (Schmitt et al. 1990; Maneechotesuwan et al. 2007). Diese zentrale Mediatorzelle bildet daraufhin die für sie typischen Zytokine Interleukin(IL)-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und GM-CSF (Robinson et al. 1992; Maneechotesuwan et al. 2007). Dadurch werden spezifische Mechanismen in Gang gesetzt oder weiter unterhalten, wie zum Beispiel die weitere Differenzierung der naiven T-Helferzellen zu Th2-Zellen mittels IL-4, wobei gleichzeitig die Entwicklung von Th1-Zellen unterdrückt wird (Bacharier et al. 1998). Über IL-5 werden eosinophile Granulozyten rekrutiert und wandern in die Atemwege ein (Shi et al. 1998).

Auch B-Zellen können Allergene mit dem B-Zell-Rezeptor erkennen und in Folge internalisieren. Durch die Präsentation der prozessierten Epitope mit MHCII-Molekülen können sie mit Th2-Zellen in Interaktion treten. Gleichzeitige Ko-Stimulation durch Bindung von CD40 und CD40-Ligand sowie vorherrschendes Th2-typisches Zytokinmilieu führt zur Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und einem Isotypenswitch von IgM zu spezifischer IgE-Antikörperproduktion gegen die Allergene (Bacharier et al. 1998). Diese IgE-Antikörper können im Blut als Zeichen der abgeschlossenen Sensibilisierung gemessen werden. Über hochaffine Fc $\epsilon$ -I-Rezeptoren werden sie zum einen auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten, zum anderen über niedrigaffine Fc $\epsilon$ -II-Rezeptoren auf Lymphozyten, Makrophagen, Epithelzellen und Dendritischen Zellen gebunden (Corne et al. 1997).

Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen tritt eine Entzündungsphase in Form einer Sofortreaktion Typ I nach Coombs und Gell sowie einer verzögerten Spätreaktion ein. Die Allergen-Epitope binden an die spezifischen IgE-Antikörper auf der Mastzell-Oberfläche und führen zu deren Annäherung und Kreuzvernetzung der Fc-Rezeptoren. Es kommt zu Mastzell-Aktivierung und Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Prostaglandinen und Leukotrienen und führt dadurch zu bronchialer Muskelkontraktion, vermehrter Mukusproduktion und Vasodilatation (Galli et al. 2005). Durch erhöhte Gefäßwandpermeabilität kommt es zur Plasmaexsudation und Ödembildung in den Atemwegen. Innerhalb kurzer Zeit kann so eine starke Atemwegsobstruktion entstehen. Zusätzlich werden durch Th2-Zytokine und Mastzellmediatoren weitere Entzündungszellen in die Atemwege rekrutiert und aktiviert. Es entsteht der Aspekt einer eosinophilen Entzündung, aktivierten mukosalen Mastzellen, Hypertrophie der Bronchialmuskulatur, Hyperplasie von Becherzellen in der Atemwegsschleimhaut und Verdickung der Basalmembran als Zeichen des Atemwegs-Remodeling (Barnes 2008; Bousquet et al. 2000). Den eosinophilen

Granulozyten wird über die Sekretion ihrer Mediatoren eine wichtige Beteiligung bei der Entstehung dieser Veränderungen zugeschrieben (Kay 2005). Sie werden auch in den Atemwegen nicht-allergischer Patienten gefunden. Hier scheint die Rekrutierung über Reizung bronchialer Epithelzellen mit der Produktion von IL-33, IL-25 und Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) und Aktivierung von Mastzellen und lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems zu erfolgen (Brusselle et al. 2013; Allakhverdi et al. 2007).

Bei vielen Patienten, insbesondere solchen mit schwer kontrollierbarem Asthma, findet sich jedoch eine neutrophile Entzündungsreaktion in den Atemwegen. Diese ist möglicherweise getrieben über Th17-Zellen und bietet dadurch eine Erklärung für das oft unzureichende Ansprechen auf Corticosteroide (Banuelos et al. 2016). Über Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 sind diese Zellen potentiell in der Lage Veränderungen wie Becherzellmetaplasie, Hypertrophie der Bronchialmuskulatur und Airway-Remodeling zu induzieren (Newcomb und Peebles 2013). Insgesamt ist die Pathogenese bei nicht Th2-getriebenen Endotypen jedoch kaum verstanden und Gegenstand aktueller Spekulation und Forschung (Agache und Akdis 2016; Ray et al. 2015).

Ausgelöst und beeinflusst werden alle molekularen Pathomechanismen durch genetische (endogene) und umweltbedingte (exogene) Faktoren, sodass es je nach deren Ausprägung zur Ausbildung eines individuellen Krankheitsbildes kommt, welches klinisch einem der bereits erwähnten Phänotypen zugeordnet wird (Martinez 2007; Wenzel 2012).

In genomweiten Assoziationsstudien wurde versucht, zugrundeliegende endogene Faktoren zu identifizieren. Die Ergebnisse zeigen starke Verbindungen von Asthma mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in vielen verschiedenen Genen, die bei Th2-getriggelter Atemwegsentszündung durch Epithelschädigung, der Down-Regulation von Atemwegsentszündungen und Remodeling eine Rolle spielen (Moffatt et al. 2010; Ramasamy et al. 2012). Beispielsweise sind SNPs in der Nähe des *IL33* Gens betroffen (Gudbjartsson et al. 2009). Das Zytokin IL-33 warnt das Immunsystem über die Produktion Th2-assoziiierter Proteine vor Epithelschäden (Moussion et al. 2008). Schlimme Exazerbationen bei kindlichem Asthma sind assoziiert mit SNPs des *CDHR3* Gens. Das Gen kodiert für ein Cadherin-Protein, welches für die Zelladhäsion und Integrität des Atemwegepithels verantwortlich ist und auch als wahrscheinlicher Zellrezeptor für eine Untergruppe von Rhinoviren dient (Bochkov et al. 2015). Variationen des Gens könnten somit zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infekten oder anderen Reizstoffen führen (Bønnelykke et al. 2014).

Als exogene Faktoren spielen Lebensumstände, wie beispielsweise Nahrungsdiversität und Rauchexposition sowie Kontakt oder Abwesenheit von bestimmten Erregern eine Rolle (Roduit et al. 2014). Die Suche nach einer Erklärung für die zunehmende Prävalenz allergischer Erkrankungen führte zu der Beobachtung, dass Kinder, die in einem erregerarmen Umfeld aufwachsen, dazu neigen, mehr allergische Erkrankungen zu entwickeln (Strachan 1989). Es konnte gezeigt werden, dass ein Leben auf dem Bauernhof und damit verbundenem, vermehrtem Kontakt zu Endotoxinen vor der Entwicklung von Asthma schützt (Braun-Fahrlander et al. 2002; Riedler et al. 2001; Ege et al. 2011). Dies kann dadurch erklärt werden, dass das Immunsystem über den Kontakt mit vielfältigen Erregern zur Ausbildung von Th1-Antworten und regulatorischen T-Zellen (Tregs) angeregt wird. Bei fehlender Exposition gegenüber einem möglichst breiten Spektrum an bestimmten Erregern während der ersten Lebensjahre kommt es so zu einer schwächeren Entwicklung von Tregs und Th1-Zellen, wodurch eine Suppression der Th2-Population und deren Mediatoren ausbleibt. Dies resultiert in der Entwicklung eines Th2-dominanten Immunsystems mit nachfolgender Sensibilisierung und Entzündung, womit die Grundlagen für allergisches Asthma geschaffen sind (Schaub et al. 2009; Daley 2014).

Hingegen kann der Kontakt mit bestimmten anderen Erregern wie Schimmelpilzen die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von Asthma erhöhen (Reponen et al. 2011). Auch die Besiedlung mit *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* oder eine Kombination aus diesen Bakterien wird mit einem erhöhten Risiko für Asthmaentwicklung verbunden (Bisgaard et al. 2007; Hilty et al. 2010). Verschiedene Virusinfektionen der Atemwege – unter anderem durch Corona-, Influenza-, Parainfluenza-, Metapneumo- und Respiratorische Synzytial-Viren – stehen in Verbindung mit dem Auftreten von Asthma bronchiale in der Kindheit und Exazerbationen bei bereits bekannter Erkrankung (Tan 2005; Edwards et al. 2012).

#### **1.1.4 Die Bedeutung von humanen Rhinoviren für Asthma bronchiale**

Besonders stark ist die Assoziation von Asthma mit humanen Rhinoviren (HRVs), die in 60-90 Prozent der Asthma-Exazerbationen in der Kindheit und in 50-80 Prozent der Fälle im Erwachsenenalter nachzuweisen sind und damit den evident größten Anteil der gefundenen Erreger ausmachen (Bizzintino et al. 2011; Johnston et al. 1995; Nicholson et al. 1993). In symptomfreien Zeiten sind die Erreger deutlich seltener nachzuweisen (Olenec et al. 2010; Iwane et al. 2011), was stark darauf hin deutet, dass Rhinoviren für die Mehrheit aller Exazerbationen von Asthma verantwortlich sind (Gern 2015). Allerdings konnten prospektive Studien auch zeigen, dass HRVs zu bestimmten Zeiten

fast ubiquitär bei Kindern vorkommen und viele dieser Infektionen, auch bei Kindern mit Asthma, asymptomatisch oder milde verlaufen (Olenec et al. 2010). Entsprechend sind Rhinovirus-Infektionen in den allermeisten Fällen eine grundlegende Voraussetzung für Exazerbationen, jedoch braucht es für eine tatsächliche Exazerbation weitere begünstigende Faktoren. Gut vorstellbar sind zusätzliches Auftreten weiterer anerkannter Noxen wie Rauch- und Allergenexposition, aber auch Therapieadhärenz oder akuter Stress beeinflussen die Situation (Gern 2015). Schwerer verlaufende Rhinovirus-Infekte wurden auch mit dem zeitlichen Auftreten in den Wintermonaten beobachtet (Lee et al. 2012). Dies ist möglicherweise auf die höhere Prävalenz von zusätzlichen anderen Erregern und potenziellen Parallelinfektionen oder auf niedrigere Vitamin D Spiegel zurückzuführen (Beard et al. 2011). Eine weitere Erklärung könnten vermehrt begünstigte Infektionen mit höher-virulenten Rhinovirustypen durch die kalte Jahreszeit sein (Linder et al. 2013).

Studien assoziieren die HRV-C Spezies mit erhöhten Krankenhauseinweisungen und vermehrten Infektionen der unteren Atemwege (Cox et al. 2013; Linder et al. 2013). In einer Studie zu Kindern mit akuten Asthma-Exazerbationen waren die meisten Isolate der Spezies C zugehörig und lösten die schwereren Verlaufsformen aus (Bizzintino et al. 2011). Andere Erhebungen sehen HRV-A Infektionen mit stärkeren und länger andauernden Symptomen assoziiert (Arden et al. 2010). Das Gesamtbild der höheren Virulenz von Spezies A und C Rhinoviren wird gestützt von Daten, nach denen diese mit 7-facher Wahrscheinlichkeit im Vergleich mit HRV-B zu schweren Erkrankungen im Kleinkindalter führen. Überhaupt scheinen HRV-B selbst bei anfälligen Kindern nur milde Erkrankungen hervorzurufen (Lee et al. 2012). Spezies A und C kommen dagegen beide häufig vor und führen zu gleichen klinischen Bildern mit Asthma-Exazerbationen und giemenden Atemwegserkrankungen (Calvo et al. 2010). Insofern scheint die unterschiedliche Virulenz der Erreger je nach HRV-Spezies oder -Typ als wichtiger Faktor die Krankheitsausprägung zu beeinflussen. Erklärungen für die unterschiedliche Virulenz sind eventuell zu finden in der ungleichen Fähigkeit sich bei hohen Temperaturen zu vermehren oder der Ausstattung mit viralen Proteasen und deren Vermögen Zellabläufe zu stören, um die Virusreplikation zu verbessern (Watters und Palmenberg 2011; Ashraf et al. 2013). Eine genaue Identifizierung einzelner verantwortlicher Typen scheint aber auf Grund der großen und sich stetig verändernden Vielfalt unterschiedlicher Virustypen wenig hilfreich (Olenec et al. 2010).

Die Symptome der Infektion entstehen, indem Rhinoviren in infizierten Zellen zu einer Beeinträchtigung der physiologischen Zellabläufe und über die Anregung zur Freisetzung von Zytokinen zu einer lokalen Entzündung führen (Wark und Gibson 2006; Piper et al. 2013). Asthmatiker infizieren sich grundsätzlich nicht häufiger mit

Rhinoviren als andere Personen, weisen aber doppelt so häufig eine Beteiligung der tiefen Atemwege mit längeren Erkrankungszeiten und einer stärkeren Symptomatik auf (Corne et al. 2002). Es gibt zahlreiche Erklärungsansätze für diese unterschiedlichen Krankheitsverläufe, jedoch keinen gesicherten Konsens. Beispielsweise ist es denkbar, dass die Virusaufnahme durch vermehrte ICAM-1 Expression oder gestörte Barrierefunktion auf Grund von Inflammation in der bronchialen Schleimhaut bei Asthmatikern erhöht ist (Manolitsas et al. 1994; Lopez-Souza et al. 2004; Zambrano et al. 2003). Eine weitere Erklärung wären die beobachtete gestörte Immunantwort und die gesteigerte Entzündungsreaktion von Asthmatikern unter HRV-Infektionen (Contoli et al. 2006; Message et al. 2008). Durch verminderte Produktion von Interferon- $\beta$  kommt es zu verminderter Apoptose infizierter bronchialer Epithelzellen asthmatischer Patienten und entsprechend vermehrter Virus-Reproduktion und Freisetzung (Wark et al. 2005). Ebenso wird eine vermehrte Expression von TSLP und damit eine Th2-getriebene Entzündung induziert (Uller et al. 2010).

Die schon im Kindesalter starke Assoziation von Rhinovirus-induzierten unteren Atemwegserkrankungen mit Giemen hat zu der Frage geführt inwieweit diese Infektionen für die Entwicklung von Asthma verantwortlich sind (Gern 2009; Sly et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Giemen unter Rhinovirus-Infektionen innerhalb der ersten drei Lebensjahre der stärkste Prädiktor – noch vor allergischer Sensibilisierung – für die Entwicklung von Asthma bronchiale mit 6 Lebensjahren ist (Jackson et al. 2008). Allerdings erfolgt das Giemen in Verbindung mit HRV-Infektionen zeitlich erst nach der allergischen Sensibilisierung (Jackson et al. 2012). Insofern sind Infektionen mit Rhinoviren in prädisponierten Individuen mit allergischer Sensibilisierung wahrscheinlich in der Lage die Pathogenese von allergischem Asthma zu fördern, indem sie die vorhandene Entzündungssituation anregen. Die Virusinfektion induziert Typ-1-Interferon Signale, welche zu einer Hochregulation der IgE-Rezeptoren auf dendritischen Zellen führen. Diese binden in Individuen mit allergischer Sensibilisierung vorhandene IgE-Moleküle, werden dann durch Allergene aktiviert und verstärken so über Zytokine und Rekrutierung von Th2-Zellen die allergische Entzündung. Dabei profitieren die Viren von der gleichzeitig stattfindenden lokalen Suppression der Th1-Immunität (Holt 2011).

### **1.1.5 Aktueller Stand der Asthmatherapie**

Derzeit existiert keine kurative Therapie des Asthma bronchiale (Barnes 2010b). Die Neigung zu Atemwegserkrankungen mit Giemen und Asthma im Kindesalter bildet sich im Laufe der Entwicklung häufig selbstständig zurück (Illi et al. 2006). Bei manifestem Asthma, insbesondere im Erwachsenenalter, handelt es sich meist um ein chronisches

Leiden, bei dem ein möglichst beschwerdefreies Leben mit der Erkrankung oberstes Behandlungsziel ist (Ernst et al. 2002). Konkret versucht man dabei durch das Konzept der Asthma-Kontrolle das Auftreten von Symptomen zu verhindern, eine normale Teilnahme am Leben zu gewährleisten und entsprechend das Risiko für Exazerbationen, Lungenfunktionseinschränkungen und Nebenwirkungen der Therapie zu minimieren (Global Initiative for Asthma 2017). Neben der Vermeidung von spezifischen Triggerfaktoren spielt vor allem die medikamentöse Therapie eine große Rolle (Martinez und Vercelli 2013). Stufenweise werden – je nach Asthma-Schweregrad – verschiedene Medikamente aus zwei Therapeutika-Gruppen kombiniert eingesetzt, um Asthma-Kontrolle zu erlangen. Schnell wirksame Bronchodilatoren dienen als Bedarfsmedikation im akuten Anfall und werden als sogenannte „Reliever“ ab der ersten Stufe eingesetzt. Die Vertreter der anderen Gruppe, sogenannte „Controller“, folgen in Form einer Dauertherapie in den höheren Stufen und sollen für die langfristige Kontrolle der Erkrankung durch langwirksame Bronchodilatation und Modulation des zugrundeliegenden Entzündungsprozesses sorgen (Global Initiative for Asthma 2017). In der Gruppe der „Reliever“ sind Beta<sub>2</sub>-Sympathomimetika das Mittel der Wahl. Sie stimulieren, nach inhalatorischer Gabe, Beta<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptoren in den Atemwegen und führen über die Adenylatcyclase zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat. Dieses sorgt über die Proteinkinase A für eine Relaxation in glatten Muskelzellen (Holgate und Polosa 2008).

In der Dauertherapie werden in erster Linie langwirksame Beta<sub>2</sub>-Agonisten sowie inhalative Kortikosteroide (ICS) eingesetzt. ICS binden an Glukocorticoid-Rezeptoren im Zytoplasma und hemmen daraufhin auf vielfältige Weise die Entzündungsreaktion, unter anderem über die Inhibition proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 oder Aktivierung der antiinflammatorischen Histondeacetylase-2 (Barnes 2010a). Damit wird in vielen Fällen eine Asthma-Kontrolle erreicht und gleichzeitig das Risiko für Exazerbationen gesenkt (Bateman et al. 2010).

Problematisch sind schwere Asthma-Formen, die per se nur unzureichend auf die derzeitige Therapie ansprechen, da sie einhergehen mit allgemeiner Glucocorticoid-Insensitivität oder Umständen in der Lebensführung wie Rauchen und Adipositas (Taylor et al. 2008; Chung et al. 2014). Unabhängig von der vorliegenden Asthma-Form ist eine ICS-Therapie nicht in der Lage den Progress der Erkrankung dauerhaft positiv zu beeinflussen (Bisgaard et al. 2006; Guilbert et al. 2006). Ebenso wenig stellt sie einen sicheren Schutz vor Schwankungen in der Asthma-Kontrolle durch Triggerfaktoren wie Allergenexposition und virale Atemwegsinfekte dar (Murray et al. 2006). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass drohende Exazerbationen unter der Therapie selbst bei einer Verdopplung der ICS-Dosis nicht verhindert werden konnten (Harrison et al.

2004). Kommt es zu Exazerbationen, resultieren vermehrte Morbidität verbunden mit dem persistierenden Verlust von Lungenfunktion, eine höhere Gefahr von Nebenwirkungen durch die benötigte Therapieintensivierung und entsprechend erhöhte Behandlungskosten (Bai et al. 2007; Blakey et al. 2013). Somit besteht für schwere Asthma-Formen insbesondere hinsichtlich der Verhinderung von Exazerbationen ein Bedarf an neuen Therapieansätzen (Ivanova et al. 2012; Barnes 2010b).

Beispiele für aktuell bereits etablierte Alternativen bzw. zusätzliche Therapieoptionen für schwere Asthma-Formen sind Leukotrien-Antagonisten, Muskarin-Antagonisten, orale Kortikosteroide, monoklonale Antikörper gegen IgE oder IL-5 sowie das interventionelle Verfahren der bronchialen Thermoplastie (Price et al. 2011; Pavord et al. 2012; Chung et al. 2014; Normansell et al. 2014; Rodrigo und Castro-Rodríguez 2015). Indirekt wird durch diese Optionen bei verbesserter Asthma-Kontrolle auch die Gefahr für Exazerbationen gesenkt. Ein effektives Mittel zur Verhinderung der ursächlichen viralen Infekte existiert bisher allerdings nicht (siehe 1.2.4). Momentan wird versucht mittels Identifikation von Risiko-Gruppen für Exazerbationen einen sinnvollen Einsatz der bereits bekannten Therapien zu gewährleisten (Bateman et al. 2015; Martin und Panariti 2017). Jedoch zeigen Analysen, dass Asthma-Kontrolle und Exazerbationsrisikoreduktion nicht immer durch die gleichen Maßnahmen verbessert werden können, sodass eine ursächliche antivirale Therapie wünschenswert wäre (Blakey et al. 2013).

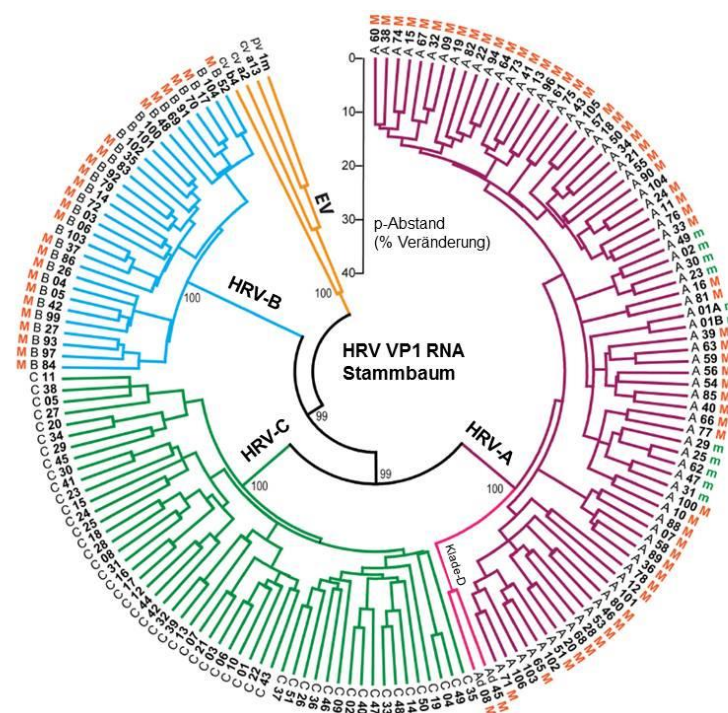
## **1.2 Die Krankheitserreger humane Rhinoviren**

Unter dem Namen banale Erkältung oder Schnupfen ist jedermann vertraut mit der Symptomatik aus verstopfter Nase, Niesattacken, schmerzendem Rachen und Husten. Als häufigste Vertreter unter den verantwortlichen Erregern dieser Infektion der oberen Atemwege sind humane Rhinoviren (HRVs) zu nennen (Monto und Ullman 1974; Heikkinen und Järvinen 2003; Jacobs et al. 2013). Mittlerweile ist bekannt, dass Rhinoviren auch die unteren Atemwege infizieren und dadurch besonders bei Kindern und immunsupprimierten Erwachsenen schwere Erkrankungen oder bei Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen gefährliche Exazerbationen auslösen können (Papadopoulos et al. 2000; Renwick et al. 2007; Gutman et al. 2007; Mallia et al. 2011). Rhinovirus-Infektionen kommen das gesamte Jahr über vor – jedoch verstärkt in Frühjahr, Sommer und Herbst – und werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Genotypen ausgelöst (Monto 2002; Savolainen et al. 2002; Peltola et al. 2008).

### **1.2.1 Systematik**

Rhinoviren gehören zur Familie der *Picornaviridae*, Genus *Enterovirus*. Enteroviren umfassen eine große Anzahl unterschiedlicher Viren, die sowohl Menschen als auch

Säugetiere infizieren können. Sie werden anhand ihrer genetischen Unterschiede, Replikationsorte und Krankheitsbeteiligung in 12 Spezies unterteilt, von denen drei durch die Rhinoviren gebildet werden: Rhinoviren A (HRV-A), Rhinoviren B (HRV-B) und Rhinoviren C (HRV-C). Der Name humane Rhinoviren weist auf die Affinität zum Respirationstrakt und den Umstand hin, dass die Erreger bisher nur beim Menschen nachgewiesen wurden (McIntyre et al. 2013). In Abgrenzung zu anderen Enteroviren besteht bei Rhinoviren eine hohe Anfälligkeit gegenüber saurem Milieu (Hughes et al. 1973). Bei der anfänglichen Unterteilung der Viren mittels Zellkulturanzüchtung und serologischen Neutralisationstests erfasste man 74 HRV-A und 25 HRV-B Serotypen (Conant und Hamparian 1968; Hamparian et al. 1987). Mittlerweile wurden mittels Molekular Diagnostik weitere Virustypen entdeckt und mit den HRV-C eine komplett neue Spezies bekannt (Dominguez et al. 2008; Lau et al. 2010). Zur genauen Einteilung dienen heute Analysen der Genomsequenz, insbesondere des Kapsidproteins VP1, sodass innerhalb der 3 Spezies aktuell 137 Typen mit 322 verschiedenen Isolaten existieren (McIntyre et al. 2013).



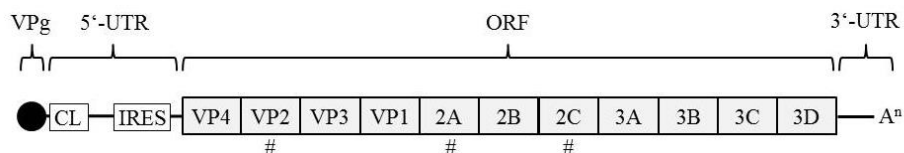
**Abb. 1 Rhinovirus-Stammbaum aller bekannten Typen anhand der VP1-RNA Genomsequenz.** Zugehörigkeit zur Major- („M“, ICAM-1) oder Minor-Group („m“, LDLR) ist angegeben, soweit experimentell nachgewiesen. Bootstrap-Werte (Prozent von 200 Replikaten) sind an entscheidenden Gabelungen angegeben. (modifiziert nach Palmenberg und Gern 2015)

Zusätzlich existieren weitere Einteilungsmöglichkeiten, beispielsweise anhand antiviraler Sensitivität (Andries et al. 1990) und Zellrezeptortyp-Spezifität (siehe unten).



## 1.2.2 Aufbau

HRVs sind als Mitglieder der Picornaviren kleine, hüllenlose Viren mit einem Durchmesser von 25-30 nm (Hahn 2012). Ihr Genom besteht aus einem positiven Einzelstrang-RNA-Molekül von etwa 7200 Basen Länge. Es lässt sich unterteilen in eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) mit einer Länge von normalerweise 650 Basen, einen durchschnittlich 6500 Basen langen Bereich, der den offenen Leserahmen (ORF) bildet, und eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) von ungefähr 50 Basen, gefolgt von einer Poly-A-Sequenz (Palmenberg et al. 2010). Am 5'-Ende ist die virale RNA kovalent mit dem Protein VPg verbunden, welches in uridylierter Form als Primer für die Replikation dient (Lee et al. 1977; Paul et al. 1998). Die 5'-UTR enthält Sequenzabschnitte wie die Cloverleaf-Struktur und die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), welche wichtig sind für Translation und Replikation (Palmenberg et al. 2009). Der ORF kodiert für ein aus circa 2100 Aminosäuren bestehendes Polyprotein, welches von viralen Proteasen in 11 Proteine prozessiert wird. Folglich wird dieser Bereich in eine entsprechende Anzahl von Abschnitten unterteilt (siehe Abb. 2). Die ersten vier Abschnitte kodieren für die Kapsidproteine (VP1-4), während die restlichen Abschnitte die Information für Proteasen, die Polymerase, VPg und weitere Proteine enthalten, welche Aufgaben in der Virusreplikation und dem Zusammenbau der Virionen erfüllen (Palmenberg et al. 2010). Außerdem befindet sich innerhalb des ORF – an unterschiedlichen Stellen je nach Virusspezies – auch das Cis-agierende Replikationselement (CRE) als wichtiges Strukturelement mit Funktion bei der Initiation der Replikation (Palmenberg et al. 2009; Steil und Barton 2009).



**Abb. 2 Schematischer Aufbau des HRV-Genoms.** Das Genom lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: zwei nicht kodierende Regionen (5'-UTR und 3'-UTR) sowie den offenen Leserahmen (ORF). Kovalent verbunden mit dem 5'-Ende der RNA ist das Protein VPg. Innerhalb der 5'-UTR liegen die Cloverleaf-Struktur („CL“) sowie die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES). Der ORF ist unterteilt in 11 Abschnitte, die für die verschiedenen viralen Proteine kodieren. Zusätzlich ist dort das Cis-agierende Replikationselement (CRE, „#“) lokalisiert: in 2A für HRV-A, in 2C für HRV-B und möglicherweise in VP2 für HRV-C (modifiziert nach Palmenberg et al. 2010)

Ein Virion besteht aus dem RNA-Genom sowie dem umhüllenden Kapsid und besitzt eine ikosaedrische Form. Insgesamt besteht das Kapsid aus jeweils 60 Kopien der einzelnen Kapsidproteine: VP4 liegt auf der Innenseite, während VP1-3 die Oberfläche mit canyonartigen Vertiefungen bilden (Rossmann et al. 1985). In deren Tiefe liegen die Bindungsstellen für die Zellrezeptoren (Colonno et al. 1988; Olson et al. 1993). Trotz stark konserviertem Faltungsmuster und gleichem Kapsidaufbau, weisen insbesondere die innersten Schichten und die exponierten antigenen

Oberflächenstrukturen starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Virustypen auf (Verdaguer et al. 2000).

### 1.2.3 Lebenszyklus

Rhinoviren vermehren sich in den Zellen des menschlichen Atemtrakts und werden von dort über Sekrete und kleine Tröpfchen ausgeschieden. So können sie direkt übertragen oder in der Umwelt auf verschiedenen Oberflächen für mehrere Stunden infektiös verbleiben und durch Kontakt aufgenommen werden (Hendley et al. 1973; Couch et al. 1966; Musher 2003). Bei der Infektion eines neuen Wirtes gelangen Viruspartikel in die Atemwege und werden von Zellen mit dem passenden Rezeptor aufgenommen. Für den Großteil der Spezies A und B, die Major Group mit 90 Typen, ist dieser Rezeptor das Interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), während 12 Typen der Spezies HRV-A, die Minor Group, den Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R) benutzen (Greve et al. 1989; Hofer et al. 1994). Als Rezeptor der Spezies HRV-C wird das Transmembranprotein CDHR3 vermutet (Bochkov et al. 2015). Rezeptortypabhängig kommt es nach Endozytose durch Porenbildung oder Lyse der Endosomen zum Übertritt des Virus-Genoms in das Zytosol (Casasnovas und Springer 1994; Prchla et al. 1994; Blaas 2016; Fuchs und Blaas 2010).

Innerhalb der Zelle wird das Einzelstrang-RNA-Molekül von den Ribosomen des Wirtes in der IRES gebunden und in ein Polyprotein translatiert, welches sich im Anschluss autokatalytisch durch seine enthaltenen Proteasen über Zwischenstufen in die jeweiligen funktionellen Proteine spaltet (Hellen et al. 1989; Lin et al. 2009). Gleichzeitig behindern und schädigen die viralen Proteasen über Spaltung von zellulären Proteinen die Wirtszelle, deren Transkription sowie Translation und stellen dadurch bevorzugt die virale Vermehrung sicher (Ziegler et al. 1995; Sommergruber et al. 1994; Seipelt et al. 2000; Amineva et al. 2004). Nach der Translation wird die Replikation des Virus durch die viralen RNA-Polymerase über Bindung des zuvor synthetisierten Virus-Proteins 3CD an die Cloverleaf-Struktur gefördert (Gamarnik und Andino 1998). Damit die Replikation starten kann, dient CRE als Vorlage für die Uridylierung von VPg durch die virale Polymerase (Gerber et al. 2001). So werden der Negativ-Strang und infolge Kopien des positiven RNA-Stangs synthetisiert (Paul und Wimmer 2015). Die Replikation verläuft mit einer hohen Mutationsrate, da die virale Polymerase keine Proof-Reading-Kapazität besitzt, sodass bei jeder Infektion von der Entstehung von Quasispezies ausgegangen wird (Palmenberg et al. 2010; Lauring und Andino 2010). Nach der Herstellung aller nötigen Bestandteile für neue Virionen, werden diese zusammengesetzt, verlassen die Zelle über Lyse oder andere Mechanismen und können den Zyklus erneut beginnen (van der Linden et al. 2015).

### 1.2.4 Prävention und Therapieansätze

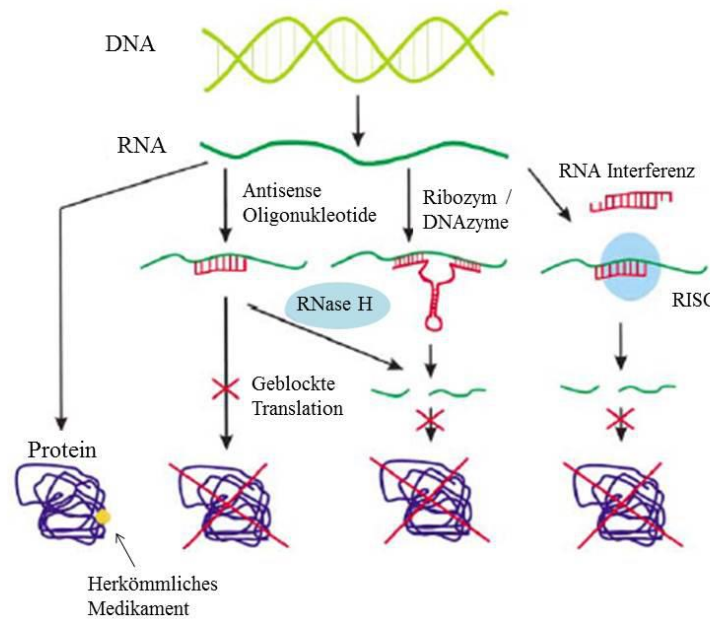
Bis heute gibt es weder zuverlässige Präventivmaßnahmen noch eine fest etablierte Therapie gegen eine Infektion mit Rhinoviren (Jacobs et al. 2013). Vorbeugend bieten physikalische Methoden wie regelmäßige Handhygiene oder Schutzmasken einen gewissen Schutz (Jefferson et al. 2011; Turner und Hendley 2005), jedoch sind diese nicht in der Lage eine Ansteckung sicher zu verhindern (Jacobs et al. 2013; Turner et al. 2012). Ebenso wenig existiert eine wirksame Impfung und der Weg bis zur Entwicklung einer solchen ist noch weit (Rohde 2011).

Therapeutisch können bisher Zink und Echinacea-Produkte eingesetzt werden, da sie gut verträglich sind und ein milder Einfluss auf die Ansteckungsgefahr und den Verlauf von Rhinovirus-Infektionen anzunehmen ist (Karsch-Völk et al. 2014; Singh und Das 2013). Der Versuch Alpha-2-Interferone therapeutisch zu nutzen war nicht erfolgreich, sondern verstärkte die Krankheitssymptome eher (Hayden et al. 1988). Viele therapeutische Ansätze versuchen gezielt bestimmte Abläufe im Lebenszyklus der Rhinoviren – wie Zellrezeptorbindung, Kapsidfunktion oder Proteasenaktivität – zu inhibieren und wurden teilweise mit nachgewiesenem Effekt in klinischen Studien getestet (Turner et al. 1999; Hayden et al. 2003a; Hayden et al. 2003b). Eine endgültige Zulassung hat bisher allerdings keine der verschiedenen entwickelten Substanzen erhalten, da entweder unzureichende Wirkung festgestellt wurde oder das Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu groß war (Senior 2002; Patick et al. 2005; Jacobs et al. 2013). Im Versagen dieser gezielten Therapieansätze zeigt sich die anspruchsvolle Aufgabe ein Medikament gegen HRV-Infektionen herzustellen. Da Rhinoviren meist nur eine leichte und selbstlimitierende Erkrankung auslösen, muss ein zukünftiges Therapeutikum die Anforderungen höchster Sicherheit mit möglichst keinen unerwünschten Wirkungen und geringer Wahrscheinlichkeit für Resistenzentwicklung erfüllen. Gleichzeitig sollte die Einnahme einfach durchzuführen sein und eine akzeptable Frequenz nicht überschreiten (Patick 2006). Erschwerend kommt hinzu, dass die große Diversität der unterschiedlichen Rhinovirustypen berücksichtigt und durch eine breite Aktivität abgedeckt werden muss. Diese hohen Anforderungen haben die Zulassung eines Medikaments bisher verhindert, letztlich aber sollten das immer größere Wissen zu humanen Rhinoviren sowie neue Ansätze und Methoden es ermöglichen ein erfolgreiches Therapeutikum zu entwickeln (Rollinger und Schmidtke 2011).

### 1.3 Antisense-basierte Strategien

Antisense-basierte Strategie bezeichnet eine molekularbiologische Methode bei der ein Ziel-Molekül von einem Antisense-Molekül angegriffen wird. Dabei handelt es sich bei

dem Ziel-Molekül zwingend um eine Nukleinsäure und bei dem Antisense-Molekül immer um eine weitere, zum Ziel komplementäre, Nukleinsäure. Die bekannten Antisense-Moleküle lassen sich auf Grund ihrer Struktur und Wirkungsweise in vier unterschiedliche Gruppen einteilen: Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme, RNA-Interferenz mit small interfering RNA (siRNA) und DNzyme. Allen gemein ist, dass sie die Ziel-Struktur spezifisch über Watson-Crick-Basenpaarung erkennen und im Anschluss, auf unterschiedliche Art und Weise inhibieren können.



**Abb. 3 Antisense Mechanismen im Vergleich** (modifiziert aus Kurreck (2003)).

Da sie relativ einfach synthetisch hergestellt werden können, bieten Antisense-Moleküle zumindest theoretisch die Möglichkeit jede beliebige zelluläre oder virale RNA spezifisch anzugreifen. Damit besteht die Chance, die mRNA eines bestimmten Genes ausschalten und die Protein-Synthese zu verhindern. Dies wird in der Forschung benutzt, um durch die Inhibition eines Genes zu erfahren, welche Aufgaben im Organismus von ihm geleistet werden. Auch für therapeutische Ansätze ist diese Technik sehr interessant, da sich die Möglichkeit bietet Krankheiten schon auf genomischer Ebene zu bekämpfen und nicht, wie es im Allgemeinen mit konventionellen Therapeutika passiert, auf Ebene der Proteine (Kurreck 2003). In den letzten Jahren wurden diese Moleküle vermehrt in klinischen Studien für Therapieansätze in unterschiedlichen Gebieten getestet (Potaczek et al. 2016).

### 1.3.1 RNA-Interferenz durch small interfering RNA

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich in der Zelle vorkommender Prozess mittels doppelsträngiger (ds) RNA, der zu einer post-transkriptionellen Regulation von Genen führt. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um einen evolutionsbiologisch alten

Abwehrmechanismus gegen unkontrollierte Proliferation oder virale Infekte handelt (Carroll et al. 2007).

Das Phänomen der RNAi wurde zuerst in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt, als beobachtet wurde, dass die Injektion von dsRNA sehr effektiv und spezifisch die endogene Genexpression unterdrücken kann (Fire et al. 1998). Der Mechanismus, als post-transkriptionelles Gen-Silencing bezeichnet, konnte in seiner Existenz wenig später auch in Pflanzen und Säugetieren nachgewiesen sowie in seinem groben Ablauf entschlüsselt werden (Hamilton und Baulcombe 1999; Elbashir et al. 2001). Lange dsRNA-Moleküle, aus endogener Produktion oder exogenen Quellen stammend, werden von Dicer, einer RNase III Endonuklease, in *small interfering RNAs* (siRNAs), mit einer Länge von 22 Basenpaaren, geschnitten (Hannon 2002). Diese Effektormoleküle bilden zusammen mit Proteinen einen *RNA induced silencing complex* (RISC), in welchem im ersten Schritt einer der siRNA-Stränge abgebaut wird. Der zurückbleibende RNA-Strang dient als Komplementär-Strang für die Suche nach Ziel-RNAs, die spezifisch erkannt, gebunden und gespalten werden können (Zamore et al. 2000; Martinez et al. 2002). Danach ist der RISC in der Lage erneut eine Ziel-RNA zu binden und zu spalten, sodass eine hoch-effektive Gen-Suppression möglich ist (Hutvágner und Zamore 2002). Durch ihr hoch entwickeltes Immunsystem sind Säugetierzellen in der Lage fremde dsRNA-Moleküle zu erkennen und in Apoptose zu gehen (Carroll et al. 2007). Dadurch ist es nicht möglich große dsRNA-Moleküle in diese Zellen einzubringen, um RNAi zu induzieren. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Immunsystem auf kleine Moleküle, von unter 30 Basenpaaren nicht reagiert, sodass siRNAs verabreicht und genutzt werden können (Elbashir et al. 2001).

### **1.3.2 Antisense-Oligonukleotide**

Antisense Oligonukleotide sind Einzelstrang-Moleküle mit einer Basenlänge von 13-25 Nukleotiden. Ihre inhibitorische Aktivität kann auf zwei unterschiedlichen spezifischen Mechanismen beruhen. Zum einen sind sie in der Lage, durch eine starke Bindung an ihr komplementäres Ziel-Molekül für eine sterische Blockade zu sorgen. So können sie verhindern, dass Ribosomen oder Proteine an das Zielmolekül binden und dadurch beispielsweise die Translation, aber auch reverse Transkription, Spleißen, Polyadenylierung, 5'-Capping oder nuklearen Export inhibieren. Für die Ausübung dieser Fähigkeit ist dementsprechend eine starke Bindung an bestimmte strategische Stellen der RNA notwendig. Als weitere Möglichkeit der Wirkungsweise ist die Aktivierung der RNase H durch das Heteroduplex aus Ziel-RNA und DNA-Oligonukleotid bekannt. Die RNase H ist ein natürlich vorkommendes Enzym, welches in der DNA-Replikation dafür zuständig ist, die RNA-Primer nach Ablauf der

Replikation zu entfernen. Antisense-Oligonukleotide mit einem Phosphodiester- oder Phosphorothioat-Rückgrat und ihre gebundene Ziel-RNA werden entsprechend ebenso erkannt. Das zelleigene Enzym degradiert den RNA-Anteil während das Oligonukleotid freigegeben wird und somit in der Lage ist, ein neues Ziel-Molekül zu binden (Dias und Stein 2002; Kurreck 2003; Carroll et al. 2007).

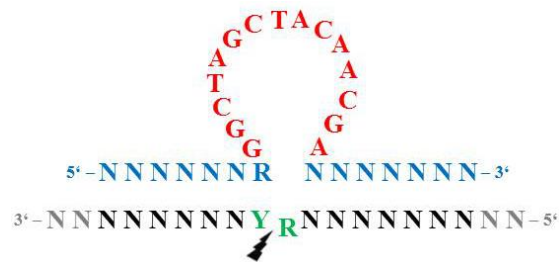
### **1.3.3 Ribozyme**

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die katalytische Aktivität besitzen. Das erste Molekül mit dieser Eigenschaft wurde Anfang der 1980er Jahre in Form eines Introns der präribosomalen RNA des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* entdeckt, welches sich selbst aus dem Transkript herausspleißen und die freigewordenen Enden der Exons miteinander verbinden kann (Kruger et al. 1982). Mittlerweile sind viele weitere, natürlich vorkommende Ribozyme bekannt, die meistens autokatalytische Spaltungs- oder Spleiß-Funktionen haben und grob in kleine (~40-160 Nukleotide) und große (>200 Nukleotide) Ribozyme unterteilt werden können (Doudna und Cech 2002). In der Forschung wurde sich besonders für die Ribozyme vom Hammerhead- und Hairpin-Typ interessiert, da sie, durch ihre einfache Struktur, geringe Größe und das Potential bei verschiedenen flankierenden Elementen ihre spezifische Spaltungs-Aktivität beizubehalten, vielfältig einsetzbar sind (Carroll et al. 2007). Ursprünglich stammen sie aus viralen Pflanzen-Pathogenen und vermitteln dort die Selbstspaltung der multimeren Produkte aus der rolling-circle-Replikation zu einzelnen Genom-Stücken (Doudna und Cech 2002). Durch die Entnahme der katalytischen Motive aus den viralen Genomen konnten künstliche trans-aktive, also intermolekular schneidende, Ribozyme geschaffen werden, die damit in der Lage waren mehrere Katalyserunden zu durchlaufen (Haseloff und Gerlach 1988). Der grundsätzliche Aufbau dieser neu erschaffenen Ribozyme besteht aus einem zentralen katalytischen Motiv und zwei angelagerten, Ziel-Sequenz-spezifischen Bindungsdomänen. Um das Ziel-Molekül schneiden zu können, benötigen alle Ribozyme außerdem eine spezifische Schnittstelle auf der Ziel-Sequenz (Carroll et al. 2007).

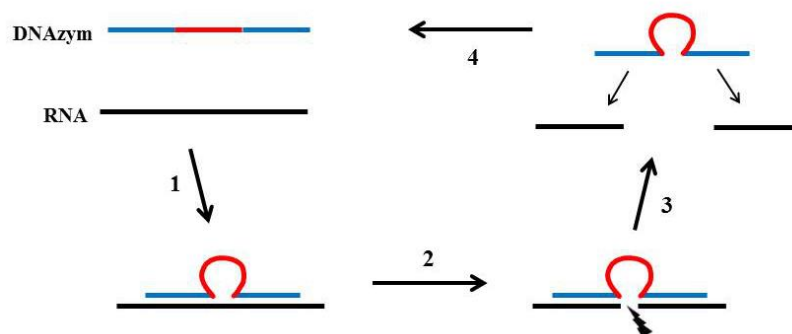
### **1.3.4 DNAzyme**

DNAzyme ist der Name für eine synthetische Gruppe von DNA-Molekülen, die katalytisch aktiv sind. Seit der ersten Entdeckung eines  $Pb^{2+}$ -abhängigen DNAzyms, das in der Lage ist RNA zu schneiden (Breaker und Joyce 1994), wurden DNAzyme mit einer Vielzahl verschiedener weiterer katalytischer Aktivitäten entwickelt. So existieren mittlerweile nicht nur DNAzyme mit der Fähigkeit RNA und DNA zu spalten, sondern ebenso zu ligieren oder auf andere Weise zu modifizieren, beispielsweise durch Phosphorylierung, Adenylierung oder Deglykosylierung (Peracchi 2005).

Ein Vertreter der RNA spaltenden DNAzyme sind die 10-23 DNAzyme. Sie wurden so entwickelt, dass sie unter „physiologischen Bedingungen“ -  $Mg^{2+}$ -abhängig, bei 37 °C und pH-Werten von 7,5 - aktiv sein und dabei eine katalytische Effektivität ( $k_{cat}/K_m$ ) von  $\approx 10^9 M^{-1} \cdot min^{-1}$  erreichen können (Santoro und Joyce 1997). Ihre Sequenz lässt sich in drei verschiedene Anteile aufteilen: eine zentrale katalytische Domäne von 15 Desoxynukleotiden und zwei flankierende variable Domänen, die für die Substraterkennung zuständig sind. Die Substraterkennung verläuft wie bei allen Antisense-Molekülen über spezifische Watson-Crick-Basenpaarungen. Durch Anlagerung der Bindungsdomänen an ihre komplementären Sequenzen kann sich die zentrale Domäne des DNAzyms konformieren, sodass sich ihre katalytische Aktivität entfaltet und das Ziel-Molekül an einer definierten Phosphodiesterbindung zwischen einem ungepaarten Purin und einem gepaarten Pyrimidin geschnitten wird (siehe Abb. 4 und Abb. 5). Es entstehen eine freie 5'-Hydroxylgruppe und ein 2'-3'-Cyclophosphat (Silverman 2005).



**Abb. 4** Schematische Struktur eines 10-23 DNAzyms während der Bindung über Watson-Crick-Basenpaarung an eine Ziel-RNA: DNAzym mit Bindungsdomänen (blau) und katalytischer Domäne (rot), Ziel-RNA mit Zielsequenzen (schwarz) und Schnittstelle (grün); R = A oder G; Y = U oder C (modifiziert aus Santoro und Joyce (1997)).



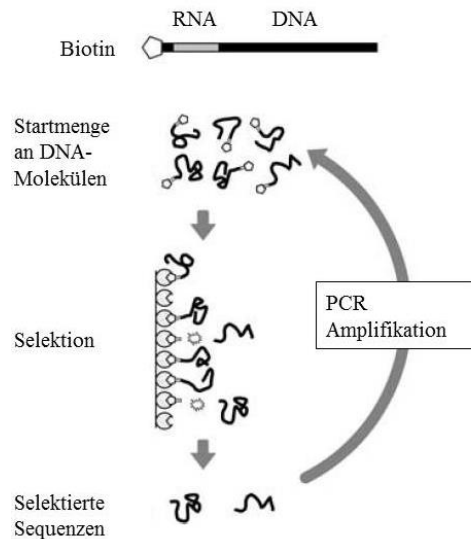
**Abb. 5** Funktionsweise eines DNAzyms: (1) Das DNAzym erkennt mit den Bindungsdomänen (blau) eine passende Zielsequenz auf der Ziel-RNA (schwarz) und bindet. Es kommt zur Konformation der katalytischen Domäne (rot). (2) Die Ziel-RNA wird gespalten. (3) DNAzym und geschnittene RNA dissoziieren. (4) Das DNAzym ist in der Lage eine neue Ziel-RNA zu binden und zu spalten.

Durch das zielgerichtete Design der Bindungsdomänen ist es möglich fast jede RNA-Sequenz als Zielstruktur zu definieren (Santoro und Joyce 1997). Die minimale Sequenz-Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen einer potentiellen Schnittstelle, welche für die 10-23 DNAzyme über ein aufeinander folgendes Purin-Pyrimidin Basenpaar definiert ist. Dabei zeigen DNAzyme gegen GU oder AU Schnittstellen bessere Aktivität als solche, die gegen GC oder AC Schnittstellen gerichtet sind (Cairns et al. 2003).

Bis heute sind keine natürlich vorkommenden DNA-Moleküle mit enzymatischer Aktivität bekannt. Dies wird darauf zurückgeführt, dass DNA in der Natur fast ausschließlich in Form eines Doppelstrangs für die Speicherung und Weitergabe genetischer Information vorkommt und deswegen keine Möglichkeit erhält katalytisch aktive Konformationen zu bilden (Breaker und Joyce 1994).

Alle heutzutage bekannten DNAzyme wurden durch eine Art künstliches Evolutionssystem, die *in vitro*-Selektion, entdeckt. Ebenso wie die entdeckten DNAzyme, wurde diese Methode mit der Zeit weiterentwickelt, funktioniert dabei in den Grundzügen aber immer auf dieselbe Weise. Zu Anfang wurde mit einer großen Anzahl unterschiedlicher DNA-Moleküle zufälliger Sequenz und einer Länge von 50 Nukleotiden gestartet. An das 5'-Ende des Moleküls wurden ein RNA Substrat sowie ein Biotin angehängt. Das RNA-Substrat bestand in den ersten Versuchen aus einem einzelnen, in späteren Versuchen aus mehreren (bspw. einer Sequenz von 12) Ribonukleotiden. Über das biotinylierte Ende wurde das gesamte Molekül an eine Streptavidin-Matrix gekoppelt und danach unter den gewünschten Reaktionsbedingungen inkubiert. Moleküle mit DNA-Sequenzen, die in der Lage waren das RNA-Substrat zu spalten, konnten sich von der Matrix lösen, aus der Lösung eluiert, mittels PCR amplifiziert und in eine weitere Selektionsrunde überführt werden (siehe Abb. 6). Nach einer ausreichenden Wiederholung dieser Schritte konnten die selektierten DNA-Sequenzen identifiziert, untersucht und modifiziert werden (Silverman 2005; Peracchi 2005).





**Abb. 6** Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion (modifiziert aus Peracchi (2005)).

## 1.4 Arbeitshypothesen und Zielsetzung des Projekts

Asthma wird vor allem dann gefährlich und führt zu einer hohen Belastung für die Betroffenen und die Gesundheitssysteme, wenn es unkontrolliert ist und Exazerbationen auftreten. Die häufigste Ursache für diese akuten Verschlechterungen der Krankheitssymptomatik sind virale Infekte – insbesondere hervorgerufen durch Rhinoviren – gegen die es bislang keine spezifische Behandlung gibt.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Schritt in Richtung einer kausalen Therapie von Rhinovirusinfektionen zu gehen. Konkret sollen spezifische DNAzyme gegen die genomische RNA repräsentativer Testviren entwickelt und in *in vitro* Versuchen auf Aktivität getestet werden. Durch die Erstellung einer umfassenden Genom-Datenbank erfolgt anschließend anhand einer *in silico* Analyse die Überprüfung der Abdeckung aller bekannten Rhinovirustypen durch die aktiven DNAzyme. Letztlich soll so ein DNAzym gefunden werden, das potentiell in der Lage ist die genomische RNA aller Rhinoviren zu zerschneiden. Es soll somit für weiterführende Versuche auf dem Weg zu einem zukünftigen Mittel gegen Rhinovirus-infektionen und damit der Verhinderung von Asthma-Exazerbationen zur Verfügung stehen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

Tab. 1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
Agar-Agar	2266.2	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumacetat	CC574116	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin	A0166	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Borsäure $\geq 99,8\%$	6943.1	Roth, Karlsruhe, D
DEPC-behandeltes Wasser	AM9915G	Ambion-Life Technologies, Waltham, MA
EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	AM9260G	Ambion-Life Technologies, Waltham, MA
Essigsäure (Eisessig) 100%	100063.2500	Merck, Darmstadt, D
Ethanol Rotipuran® $\geq 99,8\%$	9065.4	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid-Lösung (0,07%)	A2273.0015	Applchem, Darmstadt, D
Hefeextrakt	2363.1	Roth, Karlsruhe, D
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (1 M)	AM9530G	Ambion-Life Technologies, Waltham, MA
Na <sub>2</sub> EDTA	E5134-500G	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
NaCl	9265.2	Roth, Karlsruhe, D
NaCl-Lösung (1 M)	AM9760G	Ambion-Life Technologies, Waltham, MA
NaOH	9356.3	Roth, Karlsruhe, D
peqGOLD Universal-Agarose	351020	Peqlab, Erlangen, D
RNase Away®	7003	Molecular Bio Products, San Diego, Ca
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor	10777-019	Invitrogen, Carlsbad, CA
S.O.C. Medium	15544-034	Thermo Scientific, Waltham, MA
Trizma® Base	T6066-5KG	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trizma®-Hydrochlorid	T5941-100G	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypton/Peptone	8952.1	Roth, Karlsruhe, D

Tab. 2 Marker und Ladepuffer

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
50-bp DNA Ladder	25-2000	Peqlab, Erlangen, D
6x DNA Ladepuffer	R0611	Thermo Scientific, Waltham, MA
Gel Loading Buffer II	AM8546G	Ambion-Life Technologies, Carlsbad, Ca
GeneRuler DNA Ladder Mix	SM0331	Fermentas-Fisher Scientific, Schwerte, D
peqGOLD High Range RNA Leiter	26-2111	Peqlab, Erlangen, D
peqGOLD Low Range RNA Leiter	26-1011	Peqlab, Erlangen, D

Tab. 3 Kits

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
<b>HiSpeed® Plasmid Maxi Kit</b>	12663	Qiagen, Hilden, D
<b>HotStarTaq® Master Mix Kit</b>	203443	Qiagen, Hilden, D
<b>MEGAskript® Sp6 Kit - High Yield Transkription</b>	AM1330	Ambion–Life Technologies, Waltham, MA
<b>MEGAskript® T7 Kit - High Yield Transkription</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10x Reaktionspuffer</li> <li>- Ribonukleotid-Mix</li> <li>- T7 Enzym-Mix</li> <li>- Turbo DNase</li> </ul>	AM1334	Ambion–Life Technologies, Waltham, MA
<b>Omniscript® Reverse Transcription Kit</b>	205110	Qiagen, Hilden, D
<b>QIAamp® UltraSens Virus Kit</b>	53704	Qiagen, Hilden, D
<b>QIAprep® Spin Miniprep Kit</b>	27104	Qiagen, Hilden, D
<b>QIAquick® Gel Extraction Kit</b>	28704	Qiagen, Hilden, D
<b>RNeasy® Mini Kit (250)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collection Tubes</li> <li>- RLT-Puffer</li> <li>- RNeasy® Mini spin Säule</li> <li>- RPE-Puffer</li> </ul>	74106	Qiagen, Hilden, D

Tab. 4 Restriktionsenzyme und Puffer

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
<b>10x Buffer Tango</b>	BY5	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b><i>Nco</i>I</b>	ER0575	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b><i>Spe</i>I</b>	ER1251	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b><i>Eco</i>RI</b>	ER0271	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b>10x Buffer <i>Eco</i>RI</b>	B12	Thermo Scientific, Waltham, MA

Tab. 5 Vektor Systeme

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
<b>pCR®2.1-TOPO Vector System</b>	K4500	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b>pGEM®-T Easy Vector System II</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pGEM®-T Easy Vektor</li> <li>- Control Insert DNA</li> <li>- JM109 High Efficiency Competent Cells</li> <li>- 2x Rapid Ligation Buffer</li> <li>- T4 DNA-Ligase</li> </ul>	A1380	Promega, Madison, WI

Tab. 6 Verbrauchsmaterialien

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
<b>Handschuhe</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vasco Nitril White</li> <li>- Untersuchungshandschuhe Latex</li> </ul>	8815167 905453	Braun, Melsungen, D NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, D
<b>Pipettenspitzen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Biosphere® Filter Tip 20</li> <li>- Biosphere® Filter Tip 100</li> </ul>	701114210 70760212	Sarstedt, Nümbrecht, D

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
- Biosphere® Filter Tip 1000	70762211	
<b>Reaktionsgefäße</b>		
- PCR-Gefäße farblos, 0,2 ml	781305	Brand, Wertheim, D
- PCR Soft-Tubes, 0,5 ml	711098	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, D
- Multi-SafeSeal Tubes, 1,5 ml	7110,1	Carl Roth, Karlsruhe, D
- Cellstar® Tubes 50 ml	227261	Greiner Bio-One,
- Cellstar® Tubes 15 ml	188271	Frickenhausen, D
- Röhrchen 15 ml	62554002	Sarstedt, Nümbrecht, D

Tab. 7 Geräte

Name	Katalog-Nr.	Hersteller
Eis-Maschine	AF80	Scotsman, Ipswich, UK
Elektrophoresegel-Kamm 20 wells	40121420C	Peqlab, Erlangen, D
Elektrophoresekammer	401214	Peqlab, Erlangen, D
Elektrophoresis Power Supply EPS 3500		Pharmacia
Gefrierschrank HERAfreeze™ HFU T Series (-80°C)		Thermo Scientific, Waltham, MA
Gefrierschrank Liebherr Mediline (-20°C)		Liebherr, Bulle, Schweiz
Gel-Station Fusion FX7		Peqlab, Erlangen, D
Kühlschrank Liebherr Premium (4°C)		Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborabzug, geregelt	DS DG03-1200	Wesemann, Syke, D
Mikrowelle		LG, Südkorea
MSC Advantage Biological Safety Cabinet	51025427	Thermo Scientific, Langenselbold, D
NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer	F866	Thermo Scientific, Waltham, MA
<b>Pipetten</b>		
- 1000 µl	4904402	Eppendorf, Hamburg, D
- 100 µl	084284	
- 10 µl	448703	
Reax Top Vortexer	54110000000	Heidolph, Schwabach, D
ThermoCell Cooling and Heating Block	HB-202	Biozym Scientific, Hess. Oldenburg, D
Waage	L420S-D	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	10652309J	GFL, Burgwedel, D
<b>Zentrifugen</b>		
- Millifuge CT10	9055850M	Hitachi Koki, Japan
- Mikro 200R	2405	Hettich, Tufflingen, D
- Heraeus® Megafuge® 1.0R	75003060102	Kendro Lab. Prod., Osterode, D

Tab. 8 Software

Name	Hersteller
Clustal Omega – Multiple Sequence Alignment	Europäisches Bioinformatik-Institut, Hinxton, GB
LabImage 1D	Kapelan Bio-Imaging, Leipzig, D
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA

### 2.1.1 Oligonukleotide

In den folgenden Tabellen sind alle verwendeten DNAzyme und Oligonukleotide aufgeführt. Die Sequenzen sind dabei von links nach rechts in 5'-3'-Richtung aufgeführt. Die Bindungsdomänen sind in Großbuchstaben angegeben, während die katalytische Domäne klein geschrieben ist. Die Bindungsdomäne am 5'-Ende des DNAzyms wird als linke, die Bindungsdomäne am 3'-Ende des DNAzyms als rechte Bindungsdomäne bezeichnet. Bei keiner abweichenden Angabe wurden alle Oligonukleotide von der Firma BioSpring GmbH aus Frankfurt in Deutschland hergestellt.

Tab. 9 DNAzyme

Name	Sequenz
Dc16/29-01	CCACAATCAggctagctacaacgaCTGGTTCAC
Dc16-01	TGGTGACTAggctagctacaacgaAGTTCCATA
Dc16-02	CATTGGTGAggctagctacaacgaTACAGTTCC
Dc16-03	ACGCGAACAggctagctacaacgaAAAGTTCCC
Dc16-04	ATACGCGAAGgctagctacaacgaACAAAGTTC
Dc16-05	GTCACAATAggctagctacaacgaGCGAACACA
Dc16-06	CACTGGTCAGgctagctacaacgaAATACGCGA
Dc16-07	AATTGCTCAGgctagctacaacgaTGGTCACAA
Dc16-08	CCACTTTGAggctagctacaacgaTTTGTGTAA
Dc16-09	TTGTTACCAggctagctacaacgaTTTGACTTT
Dc16-10	TCCTTGTTAggctagctacaacgaCACTTTGAC
Dc16-11	TCTTGGGCAggctagctacaacgaCAAGCTTTG
Dc16-12	AGTATTGAAGgctagctacaacgaAGCTCTGGG
Dc16-13	ACTTCTGAAggctagctacaacgaTCAATTTGT
Dc16-14	CATTGTGTAggctagctacaacgaTTCTGAACT
Dc16-15	TTATAGCCAggctagctacaacgaATCATTGTG
Dc16-16	TAGGCCCAAggctagctacaacgaAGTTGTTAG
Dc16-17	TACATGTCAGgctagctacaacgaTAGGCCCAA
Dc16-18	ATGCACATAggctagctacaacgaATGTCACTA
Dc16-19	CAACATGCAGgctagctacaacgaATACATGTC
Dc16-20	GATTACCAAggctagctacaacgaATGCACATA
Dc16-21	ATTAGATTAggctagctacaacgaCAACATGCA
Dc16-22	AATAAGACAggctagctacaacgaTAAAATGGA
Dc16-23	TGAATAAGAggctagctacaacgaACTAAAATG
Dc16-24	TAATCATCAGgctagctacaacgaCTTGTGTGC
Dc16-25	GTGCAATTAggctagctacaacgaATGTTGGAA
Dc16-26	TGGGTAGTAggctagctacaacgaCTGTTTTTG
Dc16-27	GAGGTGTGAggctagctacaacgaATTAATTGG
Dc16-28	TATCTCATAggctagctacaacgaCAGTCATGA
Dc16-29	TAATATTCAGgctagctacaacgaTCTCTTGTA

Name	Sequenz
Dc16-30	TAAATTGTAggctagctacaacgaTGGATATGT
Dc16-31	GGTCCTTCaggctagctacaacgaCTATTAGTA
Dc16-32	CCTGGTTCAggctagctacaacgaATGGTCCTT
Dc16-34	TTCCCACCAggctagctacaacgaAATCACCTG
Dc16-35	AATTTCCCaggctagctacaacgaCACAATCAC
Dc16-36	TACCTATCAggctagctacaacgaTCCATGTTT
Dc16-37	GTAATAATAggctagctacaacgaCTATCACTC
Dc16-38	CCCTCACCAggctagctacaacgaCTGCTGTAA
Dc16-39	TGGCCCTCAggctagctacaacgaCACCTGCTG
Dc16-40	TGAATGCAAggctagctacaacgaATGGCCCTC
Dc16-41	TCTTCAGCAggctagctacaacgaAGTGAAAGT
Dc1B-01	ATTCTTGAaggctagctacaacgaATATGGTTC
Dc1B-02	TCTCTGTAAggctagctacaacgaTATTCTTGA
Dc1B-03	TAATAACGAaggctagctacaacgaAGGGTGTTT
Dc1B-04	TTGTAATAAggctagctacaacgaGACAGGGTG
Dc1B-05	TCTAGGACAggctagctacaacgaCAAGCTTTT
Dc1B-06	GGTCTAGGAggctagctacaacgaACCAAGCTT
Dc1B-07	TGTAAGGAaggctagctacaacgaAGCTCTAGG
Dc1B-08	GTTACACGAggctagctacaacgaTATGTGTGT
Dc1B-09	TTAGTTACAggctagctacaacgaGACTATGTG
Dc1B-10	AATTAGTTAggctagctacaacgaACGACTATG
Dc1B-11	TTTTTGTAaggctagctacaacgaATAATTAGT
Dc1B-12	GTCACATCAggctagctacaacgaCTGTTTTTG
Dc1B-13	CTGTTGTCAggctagctacaacgaATCACCTGT
Dc1B-14	CTCTAGGAaggctagctacaacgaTATAGCTGT
Dc1B-15	TGGGTCCAaggctagctacaacgaAGTTTTTCAT
Dc1B-16	TACAAATCAggctagctacaacgaTGGGTCCAA
Dc1B-17	ATGTACATAggctagctacaacgaAAATCACTG
Dc1B-18	CTACATGTAggctagctacaacgaATACAAATC
Dc1B-19	AGTTACCTAggctagctacaacgaATGTACATA
Dc1B-20	ATTAAGTTAggctagctacaacgaCTACATGTA
Dc1B-21	AGAGTTAAaggctagctacaacgaAAATGTAAA
Dc1B-22	AGTATGAAaggctagctacaacgaCAGAATTGA
Dc1B-23	TAATCATCAggctagctacaacgaCTGTAGTGT
Dc1B-24	CAGTTACAaggctagctacaacgaTAGGAATAT
Dc1B-25	GTGCAGTTAggctagctacaacgaAACTAGGAA
Dc1B-26	TTGTGTTTAggctagctacaacgaAATAATAGG
Dc1B-27	GTGGAGTAAggctagctacaacgaCTTTATTGG
Dc1B-28	GATTTTCATaggctagctacaacgaCAATCATGT
Dc1B-29	TAATATTCaggctagctacaacgaTTTCTTGGA
Dc1B-30	GGTCCTTCaggctagctacaacgaCAATTAATA
Dc1B-31	CCAGGTTCaggctagctacaacgaATGGTCCTT
Dc1B-32	CCACAATCAggctagctacaacgaCAGGTTCAC

Name	Sequenz
Dc1B-33	TTCCCACCAggctagctacaacgaAATCACCAG
Dc1B-34	AGTTTCCCAGgctagctacaacgaCACAATCAC
Dc1B-35	CCATGTCTAggctagctacaacgaAAAGAAATT
Dc1B-36	CCAATAACAggctagctacaacgaCATGTCTAC
Dc1B-37	TGCCAATAAaggctagctacaacgaACCATGTCT
Dc1B-38	CCTTACCAAggctagctacaacgaCTGCTGTAA
Dc1B-39	TGGCCTTCAggctagctacaacgaCACCTGCTG
Dc1B-40	TAAATGCTAggctagctacaacgaATGGCCTTC
Dc1B-41	ACATTGAAAggctagctacaacgaTGTCTAAGA
Dc1B-42	TCTTCAGCAggctagctacaacgaATTGAAACT
Dc1B-43	TCAGTTATAggctagctacaacgaCCTGTTCTT
Dc1B-44	CTCTCCTAaggctagctacaacgaATGTGTATA
Dc29-01	AGGACACCAggctagctacaacgaGCCTTTACA
Dc29-02	TCTAGGACAggctagctacaacgaCACGCCTTT
Dc29-03	GGTCTAGGAggctagctacaacgaACCACGCCT
Dc29-04	ATGGGACAAggctagctacaacgaTCTTGGTGG
Dc29-05	TGTATGGGAggctagctacaacgaAACTCTTGG
Dc29-06	GCCAACATAggctagctacaacgaTTGTATGGG
Dc29-07	TTAGGCCAAggctagctacaacgaATACTTGTA
Dc29-08	ATTCCACAaggctagctacaacgaTGTATCTTC
Dc29-09	TGGATTCCAaggctagctacaacgaAACTGTATC
Dc29-10	TACATGTCAggctagctacaacgaTTGGTCCAG
Dc29-11	GTGGACATAggctagctacaacgaATGTCACTT
Dc29-12	CAACGTGGAggctagctacaacgaATACATGTC
Dc29-13	AGTCACCAaggctagctacaacgaGTGGACATA
Dc29-14	ATTAAGTCaggctagctacaacgaCAACGTGGA
Dc29-15	TCTGAGTTAggctagctacaacgaAAAGGTGAA
Dc29-16	GATAAATGAggctagctacaacgaTAAATCTGA
Dc29-17	TAGTCATTAggctagctacaacgaCTGTGGTGT
Dc29-18	GTACAGTCaggctagctacaacgaAAGTAGGGA
Dc29-19	GCATCAGTAggctagctacaacgaAGTCACAAG
Dc29-20	TTATGTTTAggctagctacaacgaAGTAATAAG
Dc29-21	GGGATAATAggctagctacaacgaCTATCCTTA
Dc29-22	GACTAGTGAggctagctacaacgaTTTGATGGG
Dc29-23	CAATCATGAggctagctacaacgaTAGTGACTT
Dc29-24	TATCTCATAggctagctacaacgaCAATCATGA
Dc29-25	TAGTATTCaggctagctacaacgaTTTCTTGTA
Dc29-26	AAGATTATAggctagctacaacgaTGGATGTGT
Dc29-27	GGCCCTTCAggctagctacaacgaCAATTAAAA
Dc29-28	CCTGGTTCAggctagctacaacgaATGGCCCTT
Dc29-30	TTTCCTCCAaggctagctacaacgaAATCACCTG
Dc29-31	CCATGTTTAggctagctacaacgaATAGTAATT
Dc29-32	TTCCAATTAggctagctacaacgaTCCATGTTT

Name	Sequenz
Du16/29-01	AGGCAGCCAggctagctacaacgaGCAGGCTAG
Du16/29-02	GGTTAGCCAggctagctacaacgaATTCAGGGG
Du16/29-AU	TTAGCCACAggctagctacaacgaTCAGGGGCC
Du16-01	GCATATCAAggctagctacaacgaTTTGACCGG
Du16-02	TGCGGATAAggctagctacaacgaGATCTCAGT
Du16-03	AATGTATTAggctagctacaacgaTAGGCTTTG
Du16-04	AGCGACCAAggctagctacaacgaCAAGTATCT
Du16-05	GCTGAGCGAggctagctacaacgaCAACCAAGT
Du16-06	TTGGGTAAAggctagctacaacgaAGCTGAGCG
Du16-07	CCAGGTCTAggctagctacaacgaTGTTGGGTT
Du16-08	CCTCATCTAggctagctacaacgaCAGGTCTAC
Du16-09	AGGCTAGAAggctagctacaacgaTCCGTCGCC
Du16-11	GGCTTCACAggctagctacaacgaCCAGTGGGT
Du16-12	TTGGCTTCaggctagctacaacgaACCCAGTGG
Du16-13	TGTCCAATAggctagctacaacgaTTGGCTTCA
Du16-14	CTCTTCACAggctagctacaacgaCTTGTTCAA
Du16-15	GGCTCTTCaggctagctacaacgaACCTTGTC
Du16-16	ATGAGCACAggctagctacaacgaGCGGCTCTT
Du16-17	AGATGAGCAggctagctacaacgaACGCGGCTC
Du16-18	GCCGGAGGAggctagctacaacgaTCAAGATGA
Du16-20	TTGTGTGCaggctagctacaacgaTGGCTGCAG
Du16-21	AGCTACACAggctagctacaacgaTGGATTGTG
Du16-22	CCAGCTACAggctagctacaacgaACTGGATTG
Du16-23	GACCAGCTAggctagctacaacgaACACTGGAT
Du16-24	TCATTACGAggctagctacaacgaCAGCTACAC
Du16-25	TGCTCATTAggctagctacaacgaGACCAGCTA
Du16-31	CCATGATAAggctagctacaacgaAATATATAT
Du16-32	GTCTAGATAggctagctacaacgaTTGAGCGCC
Du16-33	GCGTACCAAggctagctacaacgaATTCTGTCT
Du16-34	GAGTGCGTAggctagctacaacgaCAACATTCT
Du16-35	CATTTGACAggctagctacaacgaCATATTTTG
Du16-36	TCCATTTGAggctagctacaacgaACCATATTT
Du16-37	GAAGCACCAggctagctacaacgaTGGAAGCTG
Du16-38	CGAGAAGCAggctagctacaacgaCACTGGAAG
Du16-39	GTGAATTTAggctagctacaacgaTGGGGTCTT
Du16-40	CATCCTTAAggctagctacaacgaTGGGTCTGT
Du16-41	TCTCCAACAggctagctacaacgaATCCTTAAC
Du16-42	TTTCTCCAaggctagctacaacgaACATCCTTA
Du1B-01	AGAATCCTAggctagctacaacgaTAAGCTCTG
Du1B-02	AGCGACCAAggctagctacaacgaCAAAGATCT
Du1B-03	GCTGAGCGAggctagctacaacgaCAACCAAAG
Du1B-04	CAAGGTCTAggctagctacaacgaTGCTGGGTA
Du1B-05	CCACTGTTAggctagctacaacgaCAGTGGGGA



Name	Sequenz
Du1B-06	GCTGGACCAggctagctacaacgaTGTTACCAG
Du1B-07	CAGGCTGGAggctagctacaacgaCACTGTTAC
Du1B-08	AGGCAGCCAggctagctacaacgaGCAGGCTGG
Du1B-09	GGCTTCACAggctagctacaacgaCTCATAAGA
Du1B-10	TTGGCTTCAggctagctacaacgaACCTCATAA
Du1B-11	CTCTTCACAggctagctacaacgaCCTGTCCAA
Du1B-12	GGCTCTTCAggctagctacaacgaACCCTGTCC
Du1B-13	GTGAGCACAggctagctacaacgaGCGGCTCTT
Du1B-14	AAGTGAGCAggctagctacaacgaACGCGGCTC
Du1B-15	GCCGGAGGAggctagctacaacgaTCAAAGTGA
Du1B-16	GTTTATGAAggctagctacaacgaCATGGCTGC
Du1B-17	TCATTACGAggctagctacaacgaCATAAGCTC
Du1B-18	TGCTCATTAggctagctacaacgaGACCATAAG
Du1B-24	GCCTAGATAggctagctacaacgaCTGGGCGCC
Du1B-25	GTGTACCAAggctagctacaacgaATTTTGCCT
Du1B-26	GAGTGTGTAggctagctacaacgaCAACATTTT
Du1B-27	CATTTGACAggctagctacaacgaTGAATTTTG
Du1B-28	TCCATTTGAggctagctacaacgaACTGAATTT
Du1B-29	TAATTTAAAggctagctacaacgaTTGATCCAT
Du1B-30	GATGCACCAggctagctacaacgaTCGAAGCAG
Du1B-31	CTGGATGCAggctagctacaacgaCACTCGAAG
Du1B-32	CATCTTTAAggctagctacaacgaTGGATCAGT
Du1B-33	TTTCTAAGAggctagctacaacgaATCTTTAAC
Du1B-34	AAGCTTCAAggctagctacaacgaAGATGGTGA
Du1B-AU	TTAGCCGCAggctagctacaacgaTCAGGGGCC
Du29-01	CAATTTAAAggctagctacaacgaCGGGGAAAC
Du29-02	TGCGGATAAggctagctacaacgaGATTTAAAT
Du29-03	AAGATGTTAggctagctacaacgaTAGGCTTTG
Du29-04	AACGACCAAggctagctacaacgaCATAAGTTC
Du29-05	GTGGAACGAggctagctacaacgaCAACCATAA
Du29-06	TTAGTGGAAggctagctacaacgaGACCAACCA
Du29-07	CCAGGTCTAggctagctacaacgaTATGGGGTT
Du29-08	GCTAGAACAaggctagctacaacgaTGTCTCCAG
Du29-09	AGGCTAGAAggctagctacaacgaACTGTCTCC
Du29-11	GGCTTCACAggctagctacaacgaCCATAGGGT
Du29-12	ATGGCTTCAggctagctacaacgaACCCATAGG
Du29-13	CTCTTCACAggctagctacaacgaCTTGTCAAA
Du29-14	GGCTCTTCAggctagctacaacgaACCTTGTC
Du29-14-L7R8	CTCTTCAggctagctacaacgaACCTTGTC
Du29-15	ATGAGCACAggctagctacaacgaGGGGCTCTT
Du29-16	AAATGAGCAggctagctacaacgaACGGGGCTC
Du29-17	GCCGGAGGAggctagctacaacgaTCAAAATGA
Du29-19	TTGCATGCAggctagctacaacgaTAGCTGCAG

Name	Sequenz
Du29-20	GACTAGCAAggctagctacaacgaATGCTGGAT
Du29-21	TCATTACGAggctagctacaacgaTAGCAACAT
Du29-22	TGCTCATTAggctagctacaacgaGACTAGCAA
Du29-28	ATATATGTAggctagctacaacgaTATATATAT
Du29-29	GTCTGGATAggctagctacaacgaTTGAGCGCC
Du29-30	GAGTTCCAaggctagctacaacgaATTTTGTCT
Du29-31	CATTTGAAaggctagctacaacgaTGAATTTTG
Du29-32	TAATTTAAAggctagctacaacgaTCGATCCAT
Du29-33	GAGGCTCCAggctagctacaacgaTTGATGCAG
Dua-01	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAG
Dua-01-L10R10	AACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L10R9	AACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAG
Dua-01-L11R10	AAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L11R9	AAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAG
Dua-01-L12R10	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L12R2	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCC
Dua-01-L12R3	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCA
Dua-01-L12R4	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAA
Dua-01-L12R5	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAA
Dua-01-L12R6	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAG
Dua-01-L12R7	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGT
Dua-01-L12R8	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTA
Dua-01-L12R9	GAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAG
Dua-01-L13R10	TGAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L14R10	GTGAAACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L2R10	CaggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L3R10	ACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L4R10	GACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L5R10	GGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L6R10	CGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L6R6	CGGACAggctagctacaacgaCCAAAG
Dua-01-L7R10	ACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L8R10	CACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L9R10	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGT
Dua-01-L9R11(C)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTC
Dua-01-L9R11(T)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTT
Dua-01-L9R12(C)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTCG
Dua-01-L9R12(T)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTTG
Dua-01-L9R13(C)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTCGG
Dua-01-L9R13(T)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTTGG
Dua-01-L9R14(C)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTCGGT
Dua-01-L9R14(T)	ACACGGACAggctagctacaacgaCCAAAGTAGTTGGT
Dua-02	AAACACGGACAggctagctacaacgaACCCAAAGT

Name	Sequenz
Dua-02-L10R10	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTA
Dua-02-L10R11	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L10R11-3'iT	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGT
Dua-02-L10R12	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGT
Dua-02-L10R13(C)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTC
Dua-02-L10R13(T)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTT
Dua-02-L10R14(C)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTCG
Dua-02-L10R14(T)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTTG
Dua-02-L10R15(C)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTCGG
Dua-02-L10R15(T)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTTGG
Dua-02-L10R16(C)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTCGGT
Dua-02-L10R16(T)	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAGTTGGT
Dua-02-L10R2	GAAACACGGAggctagctacaacgaAC
Dua-02-L10R3	GAAACACGGAggctagctacaacgaACC
Dua-02-L10R4	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCC
Dua-02-L10R5	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCA
Dua-02-L10R6	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAA
Dua-02-L10R7	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAA
Dua-02-L10R8	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAG
Dua-02-L10R9	GAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGT
Dua-02-L11R11	TGAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L12R11	GTGAAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L2R11	GAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L3R11	GGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L4R11	CGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L5R11	ACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L6R11	CACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L6R6	CACGGAggctagctacaacgaACCCAA
Dua-02-L7R11	ACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L8R11	AACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-02-L9R11	AAACACGGAggctagctacaacgaACCCAAAGTAG
Dua-03	AGTGAAACAggctagctacaacgaGGACACCCA
Dua-03-L2R12	CAGgctagctacaacgaGGACACCCAAAG
Dua-03-L3R12	ACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAG
Dua-03-L4R12	AACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAG
Dua-03-L5R12	AAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAG
Dua-03-L6R10	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAA
Dua-03-L6R11	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAA
Dua-03-L6R12	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAG
Dua-03-L6R13	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAGT
Dua-03-L6R14	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAGTA
Dua-03-L6R15	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAGTAG
Dua-03-L6R16	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCAAAGTAGT

Name	Sequenz
Dua-03-L6R2	GAAACAggctagctacaacgaGG
Dua-03-L6R3	GAAACAggctagctacaacgaGGA
Dua-03-L6R4	GAAACAggctagctacaacgaGGAC
Dua-03-L6R5	GAAACAggctagctacaacgaGGACA
Dua-03-L6R6	GAAACAggctagctacaacgaGGACAC
Dua-03-L6R7	GAAACAggctagctacaacgaGGACACC
Dua-03-L6R8	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCC
Dua-03-L6R9	GAAACAggctagctacaacgaGGACACCCA
Dua-04	AAAGTGAAAggctagctacaacgaACGGACACC
Dua-05	ATATTGTCaggctagctacaacgaCATAAGCAA
hgd40	GTGGATGGAggctagctacaacgaGTCTTGGAG

Tab. 10    Andere Oligonukleotide

Name	Sequenz
HRV-16 5'-UTR reverser Primer	GTGGGTATGCCTTTCTCCAA
HRV-16 5'-UTR vorwärts gerichteter Primer	TTCCCCGGTCAAAGTTGATA
HRV-16 CRE reverser Primer	ACCGAGCATGTGTATGTAATCAGT
HRV-16 CRE vorwärts gerichteter Primer	ATCCAGATATGGAAGTGTAGTCACC
HRV-1B 5'-UTR reverser Primer	GCCACAAGCTTCAACAGATG
HRV-1B 5'-UTR vorwärts gerichteter Primer	CGCAAAGTGCCTACACAGAG
HRV-1B CRE reverser Primer	CCATTACCAAAGGCCTCTCC
HRV-1B CRE vorwärts gerichteter Primer	CACCAATGATATGGGAACCA
HRV-29 5'-UTR reverser Primer	GAGGCTCCACTTGATGCAG
HRV-29 5'-UTR vorwärts gerichteter Primer	CACTTCTGTTTCCCCGGTTT
HRV-29 CRE reverser Primer	CCTCCCCACCTGCAGTAAT
HRV-29 CRE vorwärts gerichteter Primer	ATGTAAAGGCGTGGTGTCTCT
Loopbreaker23	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT
SP6 Primer (Seqlab, Göttingen, D)	ATTTAGGTGACACTATAG

### 2.1.2 Verwendete RNA Fragmente

Im Folgenden sind die Sequenzen aller RNA Fragmente der Testviren aufgeführt, wie sie nach Linearisierung des Plasmids mit *SpeI* und Synthese mit T7-Polymerase (HRV-29 CRE Fragment wurde mit *NcoI* linearisiert und mit SP6 synthetisiert) für die Spaltungsprüfungen benutzt wurden. Alle Fragmente enthalten an den Enden Sequenzabschnitte des pGEM®-T Easy Vektors sowie fett gedruckt die Virus-Sequenz. Unterstrichen sind die den Primern entsprechenden Sequenzen, welche für die Amplifikation benutzt wurden.

Tab. 11 HRV-1B 5'-UTR RNA Fragment

GGGCGAAUUGGGCCCCGACGUCGCAUGCUCCGGCCGCAUGGCGGCCGCGGGAAUUCG  
 AUUCGCAAAGUGCCUACACAGAGCUUAGUAGGAUUCUGAAAAGAUUUUGGUUGGU  
 CGCUCAGCUGCAUACCCAGCAGUAGACCUUGCAGAUAGAGGCUGGACAUUCCCCACU  
 GGUAACAGUGGUCCAGCCUGCGUGGCUGCCUGCACACCUCUUAUGAGGUGUGAAG  
 CCAAAGAUGGACAGGGUGUGAAGAGCCGCGUGUGCUCACUUUGAGUCCUCCGGC  
 CCCUGAAUGCGGCUAACCUUAAACCUGCAGCCAUGGUUCAUAAACCAAUGAGCUUA  
 UGGUCGUAUGAGCAAUUGCGGGAUGGGACCGACUACUUUGGUGUCCGUGUUUC  
 ACUUUUUCCUUUAUCAAUUGCUUAUGGUGACAAUAUAUACAUAAGAUAAUAUUGGC  
 AUCAUGGGCGCCAGGUAUCUAGGCAAAUUGUUGGUACACACUCAACUAAAAUUC  
 AGUGUCAAAUGGAUCAAGUUUAAAUUACUUCAAUAUAAAUUACUUUAAGGAUGCUG  
 CUUCGAGUGGUGCAUCCAGAUUAGACUUCUCUCAAGAUCCAAGCAAAUUCACUGAU  
 CCAGUUAAGAUGUCUUAGAAAAAGGAAUCCCAACACUACAAUCACCAUCUGUUGA  
AGCUUGUGGCAAUCACUAG

Tab. 12 HRV-16 5'-UTR RNA Fragment

GGGCGAAUUGGGCCCCGACGUCGCAUGCUCCGGCCGCAUGGCGGCCGCGGGAAUUCG  
 AUUUCCCCGGUCAAGUUGAUAUGCUCCACAAGGGCAAAAACAACUGAGAUCGUU  
 AUCCGCAAGAUGCCUACGCAAAGCCUAGUAAUACAUAUGAAAGAUACUUGGUUGGUC  
 GCUCAGCUGUUAACCCAACAGUAGACCUGGUAGAUGAGGCUAGAGAUUCCCCUCC  
 GGCGACGGAGUUCUAGCCUGCGUGGCUGCCUGCACACCCACUGGGUGUGAAGCCA  
 AGUAUUGGACAAGGUGUGAAGAGCCGCGUGUGCUCUUGAGUCCUCCGGCCCCC  
 UGAAUGUGGCUAACCUUAAACCUGCAGCCAGUGCACACAAUCCAGUGUGUAGCUG  
 GUCGUAUUGAGCAAUUGCGGGAUGGGACCAACUACUUUGGUGUCCGUGUUUCAC  
 UUUUUUCCUUUUAUUAUUGCUUAUGGUGACAAUAUAUAUAGCAUAUAUAUUGUU  
 AUCAUGGGCGCUCAAGUAUCUAGACAGAAUGUUGGUACGCACUCAACACAAAAUAU  
 GGUGUCAAAUGGAUCCAGCCUCAAUUAUUUAAUCAAUAUUUCAAGAUGCAG  
 CUUCCAGUGGUGCUUCUGAUUGGACUUCUCUCAAGACCCAGUAAAUUCACAGAC  
 CCAGUUAAGGAUGUGUUGGAGAAAAGGCAUACCCACAAUUCACUAG

Tab. 13 HRV-29 5'-UTR RNA Fragment

GGGCGAAUUGGGCCCCGACGUCGCAUGCUCCGGCCGCAUGGCGGCCGCGGGAAUUCG  
 AUUCACUUCUGUUUCCCCGGUUUAAAUUGAUACGCUCCACCAGGGCGAAAACAAU  
 UAAUUCGUUAUCCGCAAAAUGACUACGCAAAGCCUAGUAACAUCUUGAAGAACUUA  
 UGGUUGGUCGUUCCACUAAACCCCAUAGUAGACCUGGCAGAUAGAGGCUAGAAAUA  
 CCCACUGGAGACAGUGUUCUAGCCUGCGUGGCUGCCUGCACACCCUAUGGGUGU  
 GAAGCCAUAUUUUUGACAAGGUGUGAAGAGCCCCGUGUGCUCUUUUGAGUCCUC  
 CGGCCCCUGAAUGUGGCUAACCUUAAACCUGCAGCUAGUGCAUGCAAUCCAGCAUG  
 UUGCUGAGUCGUAUUGAGCAAUUGCGGGAUGGGACCAACUACUUUGGUGUCCGUG  
 UUUCACUUUUUCCUUUUAUUUGCUUAUGGUGACAAUAUAUAUAGUACAUAUAUAU  
 GGCAUCAUGGGCGCUCAAGUAUCCAGACAAAAUGUUGGAACUCAUUCUACCCAAAA

UUCAGUUUCAAUUGGAUCGAGUUUAAAUAUUUUAACAUAUUUACUUUAAGGAUG  
CUGCAUCAAGUGGAGCCUCAAUCACUAG

Tab. 14 HRV-1B CRE RNA Fragment

GGGCGAAUUGGGCCCGACGUCGCAUGCUCCCGGCCGCCAUGGCGGCCGCGGGAAUUCG  
 AUUCACCAAUGAUUUGGGAACCAUAUGUUCAAGAAUAGUUACAGAGAAGCAGGAAC  
 ACCCUGUCGUUAUACAACACACAUAUAUCACAAAGCUAAACACACAAAAGCUUGG  
 UGUCCUAGACCUCUAGAGCUGUCCUACACACAUAAGUCGUGUAACUAAUUAUGU  
 ACCAAAAACAGGUGAUGUGACAACAGCUAUAAGUCCUAGAGCUAGCAUGAAAACUG  
 UUGGACCCAGUGAUUUGUAUGUACAUGUAGGUAACUUAUAUAUAGGAAUUUACA  
 UUGUUUAAUCUCUGAAAUGCAUGAUUCAAUUCUGGUUUCAUACUCUUCUGAUUUAAU  
 CAUAUACCGCACAAACACUACAGGUGAUGAUUAUAUCCUAGUUGUAACUGGCACAG  
 AGGCUACCUAUUAUUGUAAAACAAAAUAGAUUAUACCCAAUAAAGGUUACUCCA  
 CAUGAUUGGUAUGAAAUCCAAGAAAGUGAAUAUUACCCUAAACAUAUCCAAUACAA  
 UUUAAUAAUUGGUGAAGGACCAUGUGAACCUGGUGAUUGUGGUGGGAAACUUCU  
 UGUAGACAUGGUGUUAUUGGCAUAAUACAGCAGGUGGUGAAGGCCAUGUAGCAU  
 UUACAGAUUCUAGACAGUUUCAUGUGCUGAAGAACAGGGUAUAACUGAUUAUAUA  
 CACAUGUUAGGAGAGGCCUUUGGUAUUGGAAUCACUAG

Tab. 15 HRV-16 CRE RNA Fragment

GGGCGAAUUGGGCCCGACGUCGCAUGCUCCCGGCCGCCAUGGCGGCCGCGGGAAUUCG  
 AUUAUCCAGAUUUGGAACUGUAGUCACCAUUGACAUGGGAACUUUGUGUUCGCGUA  
 UUGUGACCAGUGAGCAAUACACAAAGUCAAGUGGUAACAAGGAUAUAUCACAAA  
 GCCAAACACACCAAAGCUUGGUGCCCAAGACCACCCAGAGCUGUUCAAUACUCACA  
 UACACAUACCACCAACUACAAAUUGAGUUCAGAAGUACACAAUGAUGUGGCUAUA  
 GACCUAGAACAAAUCAAACACUGUUGGGCCUAGUGACAUGUAUGUGCAUGUUGG  
 UAAUCUAAUAUACAGAAAUCUACAUUAUUUAACUCUGACAUAUGAUUCCAUUU  
 UAGUGUCUUAUUCAGAUUUAAUCAUAUACCGAACAAAGCACACAAGGUGAUGAU  
 UAUAUCCAACAUGUAAUUGCACUGAAGCUACAUAUUACUGCAAAACACAAAAACAG  
 GUACUACCCAAUUAUUGUCACACCUCUAGACUGGUUAUGAGAUACAAGAGAGUGAAU  
 AUUAUCCAAAACAUAUCCAGUACAAUUACUAAUAGGUGAAGGACCAUGUGAACCA  
 GGUGAUUGUGGUGGGAAAUUAUUAUGCAAACAUGGAGUGAUAGGUUAUAUACAG  
 CAGGUGGUGAGGGCCAUGUUGCAUUCUAGAUCUUAAGACACUUUCACUGUGCUGA  
 AGAACAAGGAAUCACUGAUUACAUAACAUAGCUCGGUAAUCACUAG

Tab. 16 HRV-29 CRE RNA Fragment

GAAUACUCAAGCUAUGCAUCCAACGCGUUGGGAGCUCUCCCAUAUGGUCGACCUGCAG  
 GCGGCCGCGAAUUCACUAGUGAUUAUGUAAAGGCGUGGUGUCCUAGACCACCAAGA  
 GUUGUCCCAUACAAGUAUGUUGGCCUAAUUAUACACACUAAAGAAGAAGAUAC  
 AGUUGUGGAUCCAGACCAAGCUAAUAGACAGCUGGACCAAGUGACAUGUAUGUC  
 CACGUUGGUGACUAAUAUAUAGAAAUCUUCACCUUUGUAACUCAGAAAUGCAUGA

```

UUCAAUCCUAAUAUCAUAUUCUAUCAGAUUUAGUCAUUUAUCGAACAAACACCACAG
GUA AUGACUAUAUCCCUACUUGUGACUGUACUGAUGCAACUUAUUACUGUAAACAU
AAGGAUAGGUAUUAUCCCAUCAAAAGUCACUAGUCAUGAUUGGUAUGAGAUACAAGA
AAGUGAAUACUAUCCAAAAACAUCAGUAUAAUCUUUUAAUUGGUGAAGGGCCAU
GUGAACCAUGGAUUGUGGAGGAAAAUACUAUGUAAACAUGGAGUAAUUGGAAU
AAUUACUGCAGGUGGGGAGGAAUCGAAUCCCGCGGCCGCCAUG

```

Die zur Kontrolle verwendete humane GATA3 RNA entspricht annähernd der NCBI Referenz Sequenz NM\_001002295.1 und wurde von Mitarbeitern des Labors in einem cDNA enthaltenden pCR®2.1-TOPO Vektor bereitgestellt. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte mittels *SpeI*, die RNA-Synthese mittels T7-Polymerase.

## 2.2 Methoden

Die Arbeit lässt sich in zwei große Bereiche aufteilen. *In silico* mussten die DNAzyme entworfen, eine Virusdatenbank erstellt, die Sequenzen der verschiedenen Viren analysiert und miteinander verglichen werden. Die Überprüfung der katalytischen Aktivität der DNAzyme erfolgte anhand von Spaltungsprüfungen *in vitro*, bei denen die RNA der Testviren mit den zu testenden DNAzymen inkubiert und danach mit Hilfe von Gelelektrophorese auf den Verdau in kleinere Bestandteile überprüft wurde. Bei der Optimierung der gefundenen funktionellen DNAzyme wurden die Aktivitäten in den Spaltungsprüfungen quantitativ beurteilt und dafür mit dem Programm LabImage 1D densitometrisch ausgewertet.

### 2.2.1 Arbeit *in silico*

#### 2.2.1.1 DNAzym-Design

Alle verwendeten DNAzyme wurden nach den allgemeinen Charakteristika der 10-23 DNAzyme hergestellt. Ihre Sequenz lässt sich in einen mittleren, katalytisch aktiven Abschnitt und zwei äußere Abschnitte, die als Bindungsarme fungieren, einteilen. Der mittlere Abschnitt besteht bei jedem DNAzym vom 10-23 Typ aus der gleichen Basensequenz: GGCTAGCTACAACGA (Santoro und Joyce 1997). Die Abschnitte der Bindungsarme wurden komplementär zu den Genom-Sequenzen um die Schnittstelle der Testviren HRV-1B, -16 und -29 hergestellt und variieren deswegen in Abhängigkeit von der zu ihnen komplementären Zielsequenz.

Während der Screening Phase der Arbeit wurden zuerst alle theoretisch möglichen Schnittstellen innerhalb der genomischen Zielabschnitte identifiziert. Hierbei wurde jedes Guanin-Uracil (GU) Basenpaar als direkte Schnittstelle berücksichtigt und anhand der umliegenden Basensequenzen die Bindungsarme mit einer Länge von jeweils 9 Basen entworfen. Da sich die DNAzyme mit ihren Bindungsarmen komplementär an

die Zielsequenzen anlagern und diese erkennen sollen, wurde der linke Bindungsarm, am 5'-Ende jedes DNAzyms, revers komplementär zu den 8 Basen der Zielsequenz in 3'-Richtung neben der Schnittstelle entworfen. Entsprechend wurde der rechte Bindungsarm des DNAzyms, in 3'-Richtung neben dem mittleren Abschnitt liegend, revers komplementär zu den 9 Basen der Zielsequenz in 5'-Richtung vor der Schnittstelle konstruiert.

Nach abgeschlossener Screening Phase und *in silico* Analyse der DNAzyme wurden weitere DNAzyme hergestellt. Diese unterschieden sich von den vorherigen Oligonukleotiden in der Länge ihrer Bindungsarme. Eine Ausnahme bildeten die DNAzyme Du1B-AU und Du16/29-AU. In diesem speziellen Fall diente anstatt eines GU Basenpaares ein Adenin-Uracil (AU) Basenpaar als Schnittstelle und die umliegenden Basen als Vorlage für die Konstruktion der Bindungsarme.

Im speziellen Fall des Moleküls Loopbreaker23 wurde lediglich ein Oligonukleotid hergestellt, das revers komplementär zu der Virus-RNA Sequenz ist und dementsprechend keine katalytische Domäne enthält.

Im Rahmen der Optimierung der DNAzyme wurden Längenvarianten der bereits gefundenen funktionellen DNAzyme hergestellt. Dies bedeutet, dass die Länge der Bindungsdomänen variiert wurde, um die Eigenschaften der DNAzyme zu beeinflussen.

### 2.2.1.2 Erstellung der Virusgenom-Datenbank

Die Virusgenom-Datenbank wurde anhand der Genom-Listen aus der Veröffentlichung „Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types“ (McIntyre et al. 2013) erstellt. All jene Sequenzen, von denen eine komplette Genomsequenz gelistet ist, wurden berücksichtigt und anhand der Genbank Zugangsnummern in den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gesucht und heruntergeladen. Sofern die Virustypen mehrmals isoliert und das komplette Genom sequenziert worden ist, wurden alle Isolierungssequenzen berücksichtigt und in die Datenbank aufgenommen. Insgesamt umfasst diese Datenbank 322 Genomsequenzen: 76 Typen mit 197 Isolat aus der Spezies HRV-A, 30 Typen mit 68 Isolat aus HRV-B und 31 Typen mit 57 Isolat zugehörig HRV-C. In der folgenden Tabelle (Tab. 17) sind alle Virustypen und ihre verfügbaren Isolate mit den Genbank-Zugangsnummern aufgelistet.

Tab. 17 Auflistung der berücksichtigten Virustypen

Virustyp	Genbank-Zugangsnummern aller Isolate
HRV-A1	D00239.1; FJ445111.1; JN815255.1; JN837694.1
HRV-A2	X02316.1



Virustyp	Genbank-Zugangsnummern aller Isolate
<b>HRV-A7</b>	DQ473503.1; FJ445176.1
<b>HRV-A8</b>	FJ445113.1; FJ445170.1
<b>HRV-A9</b>	FJ445177.1; FJ445114.1; FJ445115.1
<b>HRV-A10</b>	DQ473498.1; FJ445178.1; JN798575.1; JN798582.1; JN541269.1; JN815247.1
<b>HRV-A11</b>	EF173414.1
<b>HRV-A12</b>	EF173415.1; HQ123441.1; JF781511.1
<b>HRV-A13</b>	FJ445116.1; FJ445117.1
<b>HRV-A15</b>	DQ473493.1; JN541268.1
<b>HRV-A16</b>	L24917.1; JN562722.1; JN614992.1; JN798564.1; JN798574.1; JN815253.1; JN990704.1; JX074057.1
<b>HRV-A18</b>	FJ445118.1; JF781496.1; JF781508.1
<b>HRV-A19</b>	FJ445119.1; JQ747746.1; JQ747750.1
<b>HRV-A20</b>	FJ445120.1; JN541270.1; JN614993.1; JN798571.1; JQ994494.1
<b>HRV-A21</b>	FJ445121.1; JN837693.1; JQ747747.1
<b>HRV-A22</b>	FJ445122.1
<b>HRV-A23</b>	DQ473497.1; JN621244.1; JN815254.1; JN837696.1
<b>HRV-A24</b>	EF173416.1; FJ445190.1; JN798563.1
<b>HRV-A25</b>	FJ445123.1
<b>HRV-A28</b>	DQ473508.1; JN798577.1; JN798580.1; JQ747751.1
<b>HRV-A29</b>	DQ473499.1; FJ445125.1
<b>HRV-A30</b>	DQ473512.1; FJ445179.1; JN798557.1
<b>HRV-A31</b>	FJ445126.1
<b>HRV-A32</b>	FJ445127.1
<b>HRV-A33</b>	FJ445128.1; JN815250.1; JN990707.1
<b>HRV-A34</b>	DQ473501.1; FJ445189.1; JF781510.1; JF781512.1; JN562720.1
<b>HRV-A36</b>	DQ473505.1; JF781497.1; JN614994.1; JN621243.1; JN798583.1; JN798584.1; JN815241.1; JN815242.1; JN815246.1; JN837697.1; JX074050.1
<b>HRV-A38</b>	DQ473495.1; FJ445180.1; JQ994496.1
<b>HRV-A39</b>	AY751783.1
<b>HRV-A40</b>	FJ445129.1; JN798579.1; JQ245967.1; JX074051.1
<b>HRV-A41</b>	DQ473491.1
<b>HRV-A43</b>	FJ445131.1; JN815237.1
<b>HRV-A45</b>	FJ445132.1
<b>HRV-A46</b>	DQ473506.1
<b>HRV-A47</b>	FJ445133.1; GQ223229.1; JN837692.1
<b>HRV-A49</b>	DQ473496.1; FJ445134.1; JN621241.1; JN798561.1; JN798589.1
<b>HRV-A50</b>	FJ445135.1
<b>HRV-A51</b>	FJ445136.1; JN562725.1
<b>HRV-A53</b>	DQ473507.1; JN798587.1
<b>HRV-A54</b>	FJ445138.1; FJ445139.1; FJ445173.1
<b>HRV-A55</b>	DQ473511.1; JQ837718.1
<b>HRV-A56</b>	FJ445140.1; EU840727.1
<b>HRV-A57</b>	FJ445141.1
<b>HRV-A58</b>	FJ445142.1; JX025558.1
<b>HRV-A59</b>	DQ473500.1; JN541266.1
<b>HRV-A60</b>	FJ445143.1; JN798590.1
<b>HRV-A61</b>	FJ445144.1; JN798560.1

Virustyp	Genbank-Zugangsnummern aller Isolate
HRV-A62	FJ445145.1
HRV-A63	FJ445146.1
HRV-A64	EF173417.1; FJ445181.1
HRV-A65	FJ445147.1; JF781504.1; JQ245966.1
HRV-A66	FJ445148.1; JN112340.1; JN621246.1; JQ837715.1
HRV-A67	FJ445149.1; JN621245.1
HRV-A68	FJ445150.1; JN798578.1
HRV-A71	FJ445152.1
HRV-A73	DQ473492.1
HRV-A74	DQ473494.1
HRV-A75	DQ473510.1; JF781503.1; JN837690.1
HRV-A76	DQ473502.1; FJ445182.1; JN815238.1; JX074049.1; JX074055.1
HRV-A77	FJ445154.1
HRV-A78	EF173418.1; FJ445183.1
HRV-A80	FJ445156.1; JN798586.1; JN798576.1; JN990705.1
HRV-A81	FJ445157.1; FJ445158.1; FJ445159.1; HQ123442.1
HRV-A82	DQ473509.1; FJ445160.1; JN798556.1; JN798585.1; JQ837722.1
HRV-A88	DQ473504.1
HRV-A89	M16248.1; FJ445165.1; FJ445166.1; FJ445184.1; JQ837716.1; JQ837719.1
HRV-A90	FJ445167.1
HRV-A94	EF173419.1; FJ445185.1
HRV-A96	FJ445171.1
HRV-A100	FJ445175.1
HRV-A101	GQ415051.1; GQ415052.1; JQ245965.1
HRV-A102	EF155421.1
HRV-A103	JF965515.1; JQ747749.1; JQ994499.1
HRV-A104	JN562727.1; JX074047.1; JX193797.1
HRV-A105	JN614995.1; JN990699.1
HRV-A106	JQ245971.1; JX025555.1
HRV-B3	DQ473485.1; EF173422.1
HRV-B4	DQ473490.1; JN798573.1
HRV-B5	FJ445112.1
HRV-B6	DQ473486.1; JN562723.1; JQ747745.1; JQ747748.1; JX193795.1
HRV-B14	L05355.1; K02121.1; X01087.1
HRV-B17	EF173420.1
HRV-B26	FJ445124.1
HRV-B27	EF173421.1; FJ445186.1
HRV-B35	DQ473487.1; FJ445187.1
HRV-B37	EF173423.1
HRV-B42	FJ445130.1; JN562724.1; JF781498.1; JF781507.1
HRV-B48	DQ473488.1; JN990698.1
HRV-B52	EF173424.1; FJ445188.1
HRV-B69	FJ445151.1; HQ123445.1; JN562721.1; JQ245970.1
HRV-B70	DQ473489.1; JQ245974.1
HRV-B72	FJ445153.1; GU968948.1; JN562726.1; JN614997.1; JN798562.2; JQ245969.1
HRV-B79	FJ445155.1

Virustyp	Genbank-Zugangsnummern aller Isolate
<b>HRV-B83</b>	FJ445161.1; JN990701.1
<b>HRV-B84</b>	FJ445162.1; JF781499.1; JF781502.1; JN541271.1; JN614991.1; JQ837723.1; JX074048.1
<b>HRV-B86</b>	FJ445164.1
<b>HRV-B91</b>	FJ445168.1
<b>HRV-B92</b>	FJ445169.1
<b>HRV-B93</b>	EF173425.1
<b>HRV-B97</b>	FJ445172.1
<b>HRV-B99</b>	FJ445174.1
<b>HRV-B100</b>	HQ123444.1
<b>HRV-B101</b>	JF781500.1; JF781501.1; JX074052.1
<b>HRV-B102</b>	JX074053.1
<b>HRV-B103</b>	JN614996.1; JN798572.1; JQ245972.1; JQ837717.1; JQ994497.1
<b>HRV-B104</b>	FJ445137.1; JF781506.1
<b>HRV-C1</b>	EF077279.1; HQ123443.2
<b>HRV-C2</b>	EF077280.1; JN815248.1; JN837695.1; JN990703.1; JQ245968.1; JX025557.1
<b>HRV-C3</b>	EF186077.2; JN798567.1; JN990700.1
<b>HRV-C4</b>	EF582385.1; JF781509.1
<b>HRV-C5</b>	EF582386.1
<b>HRV-C6</b>	EF582387.1; JF317016.1; JN990702.1
<b>HRV-C7</b>	DQ875932.2; JN798559.1; JN798570.1; JN837689.1; JX025556.1
<b>HRV-C8</b>	GQ223227.1; JQ245964.1; JQ245973.1
<b>HRV-C9</b>	GQ223228.1
<b>HRV-C10</b>	GQ323774.1
<b>HRV-C11</b>	EU840952.2
<b>HRV-C12</b>	JF317017.1
<b>HRV-C15</b>	GU219984.1; JF317014.1; JN837688.1
<b>HRV-C17</b>	JN815240.1; JN815244.1
<b>HRV-C22</b>	JN621242.1
<b>HRV-C25</b>	HQ123440.1; JF317013.1; JN837685.1
<b>HRV-C26</b>	JX193796.1
<b>HRV-C28</b>	JN798569.1
<b>HRV-C32</b>	JN798581.1; JQ994498.1
<b>HRV-C34</b>	JF436926.1
<b>HRV-C35</b>	JF436925.1
<b>HRV-C36</b>	JN541267.1
<b>HRV-C38</b>	JN837691.1
<b>HRV-C39</b>	JN205461.1
<b>HRV-C40</b>	JF781505.1; JN815251.1
<b>HRV-C41</b>	JN798565.1
<b>HRV-C42</b>	JQ994500.1
<b>HRV-C43</b>	JN837687.1; JX074056.1
<b>HRV-C45</b>	JN837686.1
<b>HRV-C49</b>	JF907574.1
<b>HRV-C51</b>	JF317015.1; JX291115.1

### **2.2.1.3 Analyse der Virusgenomsequenzen**

Die Virusgenomsequenzen in der erstellten Datenbank wurden auf vielfältige Weise benutzt und ausgewertet.

Um zu überprüfen wie viele der Virusstammissolate durch die aktiven DNAsyme aus den Screening-Untersuchungen abgedeckt werden können, wurden alle Genomsequenzen auf das Vorhandensein der DNAsym-Zielsequenzen überprüft. Im Falle der DNAsyme mit Schnittstellen im Bereich der 5'-UTR wurden außerdem alle Genomsequenzen, die keine Zielsequenzen enthielten, auf die Sequenzbeschaffenheit im Bereich der DNAsym Schnittstelle untersucht. So wurde unterschieden zwischen Virusstammissolaten mit bekannt unpassenden Sequenzen und solchen, deren Sequenz im Bereich der DNAsym Schnittstelle nicht ausreichend sequenziert ist (siehe Tab. 22). Anhand dieser Daten konnten genaue prozentuale Angaben zur Abdeckung der Virusstammissolate durch die gefundenen DNAsyme errechnet werden (siehe Tab. 18 und Tab. 19).

Mit dem Serviceprogramm *Clustal Omega* des Europäischen Bioinformatik-Instituts (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) wurden außerdem Sequenz-alignments der viralen Genome zur besseren Übersicht erstellt. Durch jene geordneten Auflistungen war es möglich, die Bereiche um die empfänglichen Schnittstellen zu identifizieren und genau zu untersuchen, an welchen Stellen, welche Sequenzvariationen für Lücken in der Abdeckung durch DNAsyme verantwortlich sind. Ebenso konnten die Virusgenome auf weitere mögliche Schnittstellen untersucht werden (siehe Abschnitt 3.2.1), die in den Screening-Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden, aber eine Abdeckung fast aller Virustypen ermöglichen.

## **2.2.2 Experimente *in vitro***

### **2.2.2.1 Vorbereitung - Plasmid-Konstruktion**

Vor Beginn der Arbeit wurde durch Dr. Daniel P. Potaczek und Dr. Christoph Hudemann, Mitglieder der Arbeitsgruppe, genomische RNA der Viren HRV-1B, -16 und -29 aus bereitgestellten Proben von Prof. Sebastian Johnston, einem externen Mitarbeiter vom Imperial College in London, isoliert, in cDNA umgewandelt und für die Amplifikation in einen Plasmid Vektor inseriert.

Dazu erfolgte zuerst die Isolation der Virus-RNA mittels des QIAamp® UltraSens Virus Kits mit anschließender Zwischenlagerung bei -80°C. Nach einem Prädenaturierungsschritt bei 65°C für 5 Minuten folgte im Weiteren die Synthese von cDNA mit dem Omniscript® Reverse Transcription Kit unter Zugabe von RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert bis dann, mit Hilfe des HotStarTaq® Master Mix Kits und passenden Primern,

die 5'-UTR und CRE Regionen amplifiziert wurden. Als Temperatur für die Primerhybridisierung wurden 54°C verwendet. Anschließend folgte die Separation der PCR Produkte durch Gelelektrophorese auf einem 2 prozentigem DNA-Agarose-Gel und deren Extraktion aus dem Gel mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit.

Die dadurch gereinigten PCR Produkte wurden dann zwecks Klonierung in einen pGEM®-T Easy Vektor integriert. Die Ligation des PCR Fragments mit dem Vektor wurde mittels T4 DNA-Ligase und 2x Rapid Ligation Buffer durchgeführt.

Im weiteren Verlauf wurden kompetente Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells) mit den Ligationsprodukten transformiert, gefolgt von einer kurzen Kultivierung in S.O.C. Medium, bevor die transformierten Bakterien auf LB Agar Platten überführt und über Nacht kultiviert wurden. Die LB Agar Platten wurden aus 5 g Trypton/Peptone, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 7,5 g Agar-Agar und 460 ml VE-Wasser mit Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) hergestellt. Positive Kulturen wurden von den Agar Platten in Mini-Preps transferiert und eine Nacht mit Standard LB Medium (10 g Trypton/Peptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl und 960 ml VE-Wasser) mit Ampicillin (100 µg/ml) kultiviert. Anschließend wurde mittels des QIAprep® Spin Miniprep Kits die Plasmid DNA isoliert. Überprüfung der Klonierungseffektivität erfolgte anhand von Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und anschließender Gelelektrophorese auf einem 1,5 prozentigem DNA-Agarosegel sowie Sequenzierung des Plasmids in der Region der inserierten Bereiche mit Hilfe eines Standard SP6 Primers. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Bakterien mit den gewünschten Klonen ausgewählt und für Maxi-Preps erneut über Nacht in Standard LB Medium mit Ampicillin expandiert. Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mittels HiSpeed® Plasmid Maxi Kit. Nach erneuter Kontroll-Sequenzierung mit dem Standard SP6 Primer wurden die isolierten Plasmide bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.2.2 RNA-Herstellung aus Plasmiden**

Aus den freundlicherweise von Dr. Daniel P. Potaczek hergestellten cDNA enthaltenden Plasmiden wurde mit Hilfe des MEGAskript® T7 Kits (sowie des MEGAskript® SP6 Kits im Falle der CRE Region von HRV-29) Virus RNA der 5'-UTR und CRE Regionen von HRV-1B, -16 und -29 hergestellt (für Sequenzen siehe Abschnitt 2.1.2) und danach durch Verwendung des RNeasy® Mini Kits gereinigt. Zuvor musste jedoch linearisierte DNA aus den zirkulären Plasmiden hergestellt werden.

##### **2.2.2.2.1 Plasmid-Linearisierung**

Für diesen Schritt wurden je Mikrogramm zu linearisierende DNA-Probe, welche in Form des pGEM®-T Easy Vektors (oder für GATA3 in Form des pCR®2.1 TOPO

Vektors) vorlag, ein Gemisch aus DNA-Probe, 10 U (1 µl) Restriktionsenzym, 1 µl Puffer (10x Buffer Tango) und Wasser mit einem Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt. Dabei wurde für Linearisierung der Plasmide mit Sequenzen von GATA3, der 5'-UTR von HRV -1B, -16 und -29 sowie der CRE Region von HRV -1B und -16 das Restriktionsenzym *SpeI* genutzt. Für das Plasmid mit der Sequenz der CRE Region von HRV-29 wurde das Restriktionsenzym *NcoI* verwendet. Die Ansätze wurden für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf Eis gestellt.

#### **2.2.2.2.2 DNA-Fällung**

Um die DNA aus der Lösung zu fällen, wurden pro Mikrogramm linearisierter DNA-Probe 20 µl eisgekühltes Ethanol, 1,5 µl EDTA-Lösung (0,5 M) und 3 µl Ammoniumacetat-Lösung (5 M) hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und kurz herunterzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei -20°C. Danach galt es den Ansatz für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zu zentrifugieren. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und das Reaktionsgefäß für 30 Minuten offen bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde das glasige Pellet in 8 µl RNase freiem Wasser, pro Mikrogramm enthaltener DNA, resuspendiert.

#### **2.2.2.2.3 Überprüfung der erfolgreichen Linearisierung**

Um die erfolgreiche Linearisierung der Plasmide zu überprüfen, wurde aus jeder Probe mit linearisiertem Plasmid ein 500 ng DNA enthaltendes Volumen entnommen und auf ein DNA-Agarose-Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Zur Kontrolle wurden Proben mit gleicher Menge an zirkulärem Plasmid aufgetragen. Die Linearisierung wurde als erfolgreich gewertet (und die DNA-Probe weiterverwendet), wenn eine klar abzugrenzende Bande mit zum Virus-Plasmid Fragment passender Länge auf dem Gelbild zu erkennen war.

#### **2.2.2.2.4 In vitro Transkription**

Je 8 µl des in Wasser resuspendierten, linearisierten Plasmids wurden mit 8 µl Ribonukleotid-Mix, 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl T7 Enzym-Mix vermischt. Der Ribonukleotid-Mix wurde zu je 25% aus 75 mM ATP, CTP, GTP und UTP hergestellt. Nachdem der Reaktionsansatz vermischt und kurz herunterzentrifugiert worden war, folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei 37°C. Nach Ablauf dieser Zeit wurde 1 µl Turbo DNase hinzugefügt, vermischt, herunterzentrifugiert und erneut bei 37°C, diesmal für 15 Minuten inkubiert.

#### **2.2.2.2.5 Aufreinigung von RNA**

Die 21 µl Probevolumen aus der *in vitro* Transkription wurden mit 79 µl DEPC-behandeltem Wasser auf ein Volumen von 100 µl eingestellt und unter Hinzugabe von

350 µl RLT-Puffer gut vermischt. Als nächstes wurden 250 µl Ethanol (96-100%) addiert. Das Gesamtvolumen von 700 µl wurde nach erneut gutem Mischen auf eine RNeasy® Mini spin Säule aufgetragen und in ein 2 ml Collection Tube platziert. Daraufhin wurde für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Das Filtrat im Collection Tube wurde verworfen und die Säule mit 500 µl RPE-Puffer beladen. Es folgte ein weitere 15 Sekunden bei 8000 g in der Zentrifuge und eine erneute Entsorgung des Filtrats. Danach wurde die Säule zum zweiten Mal mit 500 µl RPE-Puffer beladen und diesmal für 2 Minuten bei 8000 g zentrifugiert.

Die gereinigte Probe wurde dann in der RNeasy® Spin Säule in ein 1,5 ml Sammelgefäß überführt. Zur Elution wurde die Säule mit 50 µl DEPC-behandeltem Wasser beladen, 1 Minute gewartet um das Wasser einwirken zu lassen und danach für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert. Die erhaltene Probe im Sammelgefäß wurde zur späteren Messung der Konzentration auf Eis gestellt. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß platziert und der Elutionsschritt mit einem Volumen von 30 µl DEPC-behandeltem Wasser wiederholt.

#### **2.2.2.3 Konzentrationsmessung von Nukleinsäure-Lösungen**

Die Konzentrationen der Nukleinsäure-Lösungen wurden mit dem NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer bestimmt. Als Leerprobe wurde 1 µl DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Vor der Messung der eigentlichen Probe wurde diese gut durchmischt und dann 1 µl auf die Messvorrichtung aufgetragen.

#### **2.2.2.4 DNA-Agarose-Gel**

Die Gele für die DNA-Gelelektrophorese wurden aus Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) und Agarose hergestellt. Bei der Vorbereitung des TBE-Puffers wurden Trizma® Base und Borsäure in vollentsalztem (VE-)Wasser gelöst, Na<sub>2</sub>EDTA hinzugegeben und mit VE-Wasser aufgefüllt, sodass eine Arbeitslösung mit 89 mM Trizma® Base, 89 mM Borsäure und 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA entstand. Nach Abmessen von 0,8 g Agarose wurden 110 ml TBE-Puffer hinzugegeben, im Erlenmeyerkolben vermischt und danach in der Mikrowelle erhitzt bis keine Schlieren mehr in der Lösung zu erkennen waren. Daraufhin erfolgte die Zugabe eines Tropfens Ethidiumbromid-Lösung, der unter leichtem Schwenken gleichmäßig verteilt wurde. Die fertige Lösung wurde in den vorbereiteten Schlitten mit Kamm gegossen, darauf bedacht keine Luftblasen entstehen zu lassen, und für 30 Minuten zum Aushärten stehen gelassen. Danach war das 0,8% Gel fertig zum Überführen in die mit TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer. Es wurde ein Tropfen Ethidiumbromid-Lösung in das untere Ende der Elektrophorese-Kammer gegeben und dann jeweils 500 ng DNA pro Tasche aufgetragen. Dies entsprach, je nach Konzentration, 0,7-4,0 µl Plasmid. Jede Probe

wurde mit DEPC-Wasser auf 10 µl angeglichen und mit je 2 µl 6x DNA Ladepuffer versetzt, vermischt, kurz herunter zentrifugiert und komplett aufgetragen. Als Längenmarker wurden zwei Proben mit je 1 µl Längenmarker (50-bp DNA Ladder sowie GeneRuler DNA Ladder Mix), 9 µl Wasser und 2 µl 6x DNA Ladepuffer benutzt. Nach einer Stunde Laufzeit bei 120 V wurden die Ergebnisse an der Gel-Dokumentationsstation visualisiert und festgehalten.

#### **2.2.2.5 RNA-Agarose-Gel Herstellung**

Die Gele für die RNA-Gelelektrophorese wurden aus Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) und Agarose hergestellt. Bei der Vorbereitung des TAE-Puffers wurde Trizma® Base in Millipore-Wasser gelöst, Na<sub>2</sub>EDTA und Eisessig hinzugegeben und mit Millipore-Wasser aufgefüllt, sodass eine Arbeitslösung mit 40 mM Trizma® Base, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA und 20 mM Eisessig entstand. Nach Abmessen von 2,5 g Agarose wurden 110 ml TAE-Puffer hinzugegeben, im Erlenmeyerkolben vermischt und danach in der Mikrowelle erhitzt bis keine Schlieren mehr in der Lösung zu erkennen waren. Daraufhin erfolgte die Zugabe eines Tropfens Ethidiumbromid-Lösung, der unter leichtem Schwenken gleichmäßig verteilt wurde. Die fertige Lösung wurde in den vorbereiteten Schlitten mit Kamm gegossen, darauf bedacht keine Luftblasen entstehen zu lassen, und für 30 Minuten zum Aushärten stehen gelassen. Danach war das 2,5% Gel fertig zum Überführen in die mit TAE-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer. Ein weiterer Tropfen Ethidiumbromid-Lösung wurde direkt in die Gelelektrophorese-Kammer gegeben, um anschließend die RNA-Proben in die Geltaschen zu füllen.

#### **2.2.2.6 Testung der katalytischen Aktivität der DNAsyme in vitro**

Zur Überprüfung der katalytischen Eigenschaften der DNAsyme wurden Spaltungsprüfungen durchgeführt. Dabei wurde Virus-RNA mit den zu testenden DNAsyemen versetzt, unter standardisierten Reaktionsbedingungen inkubiert und das Reaktionsergebnis anhand einer Gelelektrophorese überprüft und dokumentiert.

Zu Beginn wurde ein TNM-Mix, bestehend aus gleichen Mengen 500 mM Trizma®-Hydrochlorid (mit vorher eingestelltem pH-Wert von 7,4), 1 M NaCl und 10 mM MgCl<sub>2</sub> (aus 1 M MgCl<sub>2</sub> mit DEPC-freiem Wasser verdünnt), hergestellt.

##### **2.2.2.6.1 Qualitative Testung**

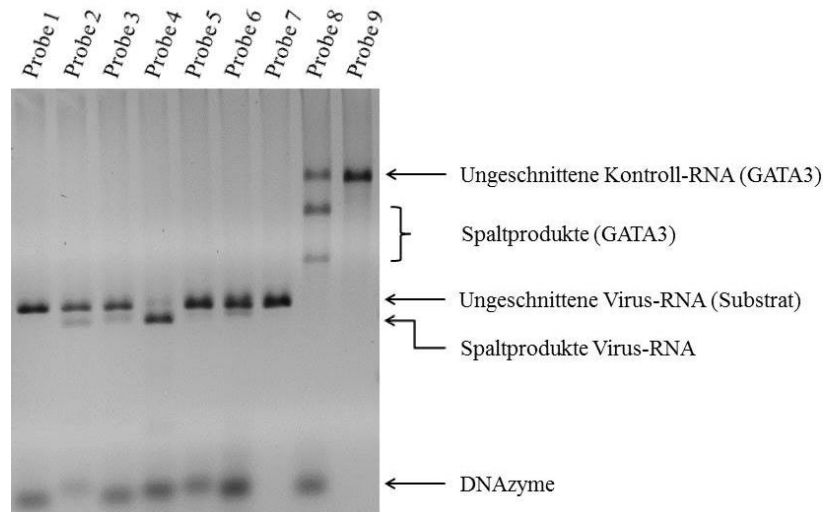
Für die qualitative Testung der DNAsyme wurden, soweit nicht abweichend angegeben, pro Probe 3 µl des TNM-Mix mit 1,5 µl (150 ng) Virus-RNA und 2 µl (20 pmol) DNAsym in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß gegeben, mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und vermischt. Als Negativ-Probe wurde bei jedem Versuch zu einer Probe kein DNAsym hinzugegeben und die Volumendifferenz mit DEPC-behandeltem Wasser ausgeglichen. Neben den Proben



mit Virus-RNA wurden bei jeder Spaltungsprüfung auch zwei Proben mit 250 ng humaner GATA3-RNA angesetzt, von der eine als Positiv-Kontrolle mit 10 pmol des DNazym hgd40, die andere als Negativ-Kontrolle mit DEPC-behandeltem Wasser versetzt wurde. Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend wieder auf Eis gegeben und jeweils 5 µl RNA Loading Buffer hinzugegeben. Zusätzlich wurde je ein neues Reaktionsgefäß mit 1 µl High Range RNA Leiter und Low Range RNA Leiter gefüllt sowie jeweils mit 9 µl DEPC-behandeltem Wasser und 5 µl RNA Loading Buffer aufgefüllt. Alle Ansätze wurden vermischt und dann für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, bevor die Proben auf ein RNA-Gel aufgetragen wurden. Die Proben liefen für 40 Minuten bei 120 Volt und wurden danach zum ersten Mal orientierend ausgewertet. Es folgten mindestens weitere 15 Minuten Laufzeit bei 120 Volt bis zur eindeutigen Auftrennung der einzelnen Banden und der endgültigen Auswertung mittels Gel-Station Fusion FX7 Analysekamera.

Ein schneidendes DNazym ist in der Lage die Ziel-RNA an der Schnittstelle in zwei Stücke zu teilen, sodass auf dem Gelbild neben der ungeschnittenen RNA-Bande zwei weitere Banden, die kürzeren Spaltprodukte, zu erkennen sind. Als Negativ-Kontrolle wurde in jedem Versuch mit qualitativer Testung eine Probe viraler RNA mit Wasser anstatt DNazym inkubiert und aufgetragen. Entsprechend darf in dieser Probe nur die Bande der ungeschnittenen RNA zu erkennen sein. Als Positiv-Kontrolle sind in jedem Versuch zwei Proben humaner GATA3-RNA enthalten. Eine wurde mit Wasser inkubiert und blieb unverdaut als Negativ-Kontrolle, während die andere, mit dem bereits getesteten DNazym hgd40, verdaut wurde und anzeigt, dass während des Versuchs die benötigten Reaktionsbedingungen für die zu testenden DNazyme vorlagen. Die Spaltungsstärke wurde qualitativ anhand der Bandenintensität ausgewertet und dabei in vier Abstufungen unterteilt. Sobald Spaltprodukte erkennbar waren, wurde dies als schwache (+) Aktivität gewertet. Wenn zusätzlich eine Abnahme der Intensität der ungeschnittenen RNA-Bande vorlag, wurde dies als mäßige (++) Aktivität gewertet. Erreichten die Spaltprodukte eine höhere Intensität als die ungeschnittene Bande, wurde es als starke (+++), bei annähernd komplettem oder komplettem Verschwinden der ungeschnittenen Bande als ausgezeichnete (++++) Aktivität gewertet.

Die folgende Abbildung (siehe Abb. 7) zeigt beispielhaft das Bild einer Spaltungsprüfung:



**Abb. 7 Beispiel für eine Spaltungsprüfung:** Probe 1-6 enthalten Virus-RNA (150 ng) und zu testende DNAzyme (2mM); Probe 7 dient mit Virus-RNA (150 ng) ohne DNAzym als Negativ-Kontrolle; Probe 8 dient mit GATA3-RNA (250 ng) und hgd40 (1mM) als Positiv-Kontrolle; Probe 9 dient mit GATA3-RNA (250 ng) ohne hgd40 als GATA3-Negativ-Kontrolle; 2,5% TAE-Agarosegel

Anhand der starken (++++) Aktivität der Positiv-Kontrolle in Probe 8 lässt sich erschließen, dass die erforderlichen Reaktionsbedingungen vorlagen. Das DNAzym in Probe 1 zeigt keine Aktivität. Schwache (+) Aktivität lässt sich in Proben 2, 3, 5 und 6 beobachten, während in Probe 4 ein DNAzym mit ausgezeichneter (++++) Aktivität gefunden wurde. Die hier positiv getesteten DNAzyme gegen die Virus-RNA (Proben 2-6) besitzen Schnittstellen im Bereich eines Endes der RNA-Fragmente. Die entstandenen Spaltprodukte weisen dadurch deutliche Längendifferenzen auf. Das längere Spaltprodukt ist geringfügig kürzer als die virale Substrat-RNA, die entsprechenden Banden zeigen kleine Laufstreckenunterschiede und sind dadurch als zwei, voneinander abgrenzbar, untereinanderliegende Banden zu erkennen. Das kürzere Spaltprodukt ist sehr kurz und die entsprechende Bande deswegen nicht auf dem Bild zu sehen. Das DNAzym GATA3 besitzt eine Schnittstelle im mittleren Bereich der GATA3-RNA, wodurch zwei deutlich kürzere Spaltprodukte mit unterschiedlicher Länge entstanden sind. Die entsprechenden Banden der Spaltprodukte und ungeschnittenen GATA3-RNA sind alle drei, deutlich voneinander aufgetrennt, in Probe 8 zu sehen.

#### 2.2.2.6.2 Quantitative Testung

Für die Optimierung der gefundenen DNAzyme wurden Spaltungsprüfungen unter veränderten und strikt standardisierten Bedingungen durchgeführt, um die Bilder der Gelelektrophorese quantitativ anhand von densitometrischen Messungen mittels LabImage 1D auswerten zu können. Ziel dieser Versuche war es, die ideale Länge der Bindungsdomänen herauszufinden und die prozentuale Spaltungsaktivität festzustellen.

Für die quantitative Testung der DNAzyme wurden pro Probe 3 µl des TNM-Mix mit 1,5 µl (150 ng) Virus-RNA, 0,5 µl (125 ng) GATA3-RNA und 4 µl (20 pmol) DNAzym in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß gegeben, mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und vermischt. Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als Negativ-Probe und Referenzmenge an ungeschnitten-verbliebenem viralen RNA-Substrat für die densitometrische Messung wurde bei jedem Versuch eine Probe mit DNAzym versetzt, aber auf Eis gelassen und nicht inkubiert, sodass keine Reaktion stattfinden konnte. Nach der Inkubation wurden die Proben wieder auf Eis gegeben und jeweils 5 µl RNA Loading Buffer hinzugegeben. Da in den vorangegangenen Experimenten festgestellt worden war, dass die Bandenintensität der äußeren Gelladetaschen starken intra- und interexperimentellen Schwankungen unterliegt, wurde entschieden nur die mittleren Ladetaschen für die quantitative Testung zu beladen. Für die Beladung der äußeren Taschen des Elektrophorese Gels wurden weitere Proben hergestellt, jedoch nicht in die Auswertung einbezogen. So wurden die Geltaschen direkt seitlich der Versuchsproben immer mit Proben beladen, die 3 µl des TNM-Mix, 1,5 µl (150 ng) Virus-RNA und 0,5 µl (125 ng) GATA3-RNA jedoch kein DNAzym enthielten, sondern eine der Volumendifferenz entsprechenden Menge DEPC-behandeltes Wasser und 5 µl RNA Loading Buffer. Die zwei äußersten Geltaschen wurden auf beiden Seiten mit Proben beladen, die 1 µl High Range RNA Leiter, bzw. 1 µl Low Range RNA Leiter enthielten - jeweils aufgefüllt mit 9 µl DEPC-behandeltem Wasser und 5 µl RNA Loading Buffer. Alle Ansätze wurden vermischt und dann für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, bevor die Proben auf ein RNA-Gel aufgetragen wurden. Die Proben wurden für 50 Minuten bei 120 Volt laufen gelassen und dann mittels einer Gel-Station Fusion FX7 Analysekamera ausgewertet. Die so entstandenen Bilder wurden im Anschluss quantitativ anhand von densitometrischen Messungen mittels LabImage 1D ausgewertet. Dabei wurde zur Reduktion des Hintergrundsignals bei allen Bildern die Programmeinstellung Rollende Scheibe mit einem Radius von 15 gewählt. Gemessen wurden jeweils die Bandenintensitäten der viralen Substrat-RNA und der GATA3-RNA. Durch Herstellung der initialen Probenansätze aus TNM-Mix, viraler RNA und GATA3-RNA als Mastermix wurde sichergestellt, dass jede einzelne Probe das gleiche Verhältnis von viraler RNA zu GATA3-RNA enthielt. Dadurch konnten die Bandenintensitäten der viralen RNA über Verrechnung mit der Bandenintensität der zugehörigen GATA3-RNA als interne Kontrolle untereinander vergleichbar gemacht und etwaige, durch spätere Versuchsschritte entstandene, Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Proben ausgeglichen werden. Als Referenzwert zur Berechnung der prozentual

verbliebenen Substratmenge wurde immer die Bandenintensität der nicht inkubierten Probe als Negativ-Kontrolle genutzt.

Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der Messergebnisse sowie deren Standardabweichung und Standardfehler ermittelt.

### 3 ERGEBNISSE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, DNAzyme zu entwickeln, die in der Lage sind spezifisch die genomische RNA von humanen Rhinoviren zu schneiden. Dabei waren zwei Zielpunkte von enormer Wichtigkeit. Es mussten DNAzyme identifiziert werden, die ausreichend schneidende Aktivität gegen die Virus-RNA zeigen, um somit einen gezielten Abbau dieser RNA gewährleisten zu können. Gleichzeitig sollten die DNAzyme möglichst gegen alle bekannten Virustypen Aktivität zeigen, um bei jeder Infektion mit humanen Rhinoviren einsetzbar und wirksam zu sein, ohne dass eine vorausgehende Identifizierung des für die Infektion verantwortlichen Typs notwendig ist.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde schon vor Beginn dieser Arbeit durch Vorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe eine systematische Analyse des HRV Genoms unternommen. Um die Chance auf eine möglichst vollständige Abdeckung aller Virusstämme zu gewährleisten, wurde entschieden nach Zielsequenzen in den Bereichen der 5'-UTR sowie der CRE Region, zwei hoch konservierten Abschnitten auf dem viralen Genom, zu suchen. Als repräsentative Vertreter für die anderen HRVs wurden drei Testviren HRV-1B, -16 und -29 aus der Spezies HRV-A gewählt. Durch diese Auswahl beinhalten die Testviren sowohl Vertreter aus der Major Group als auch aus der Minor Group.

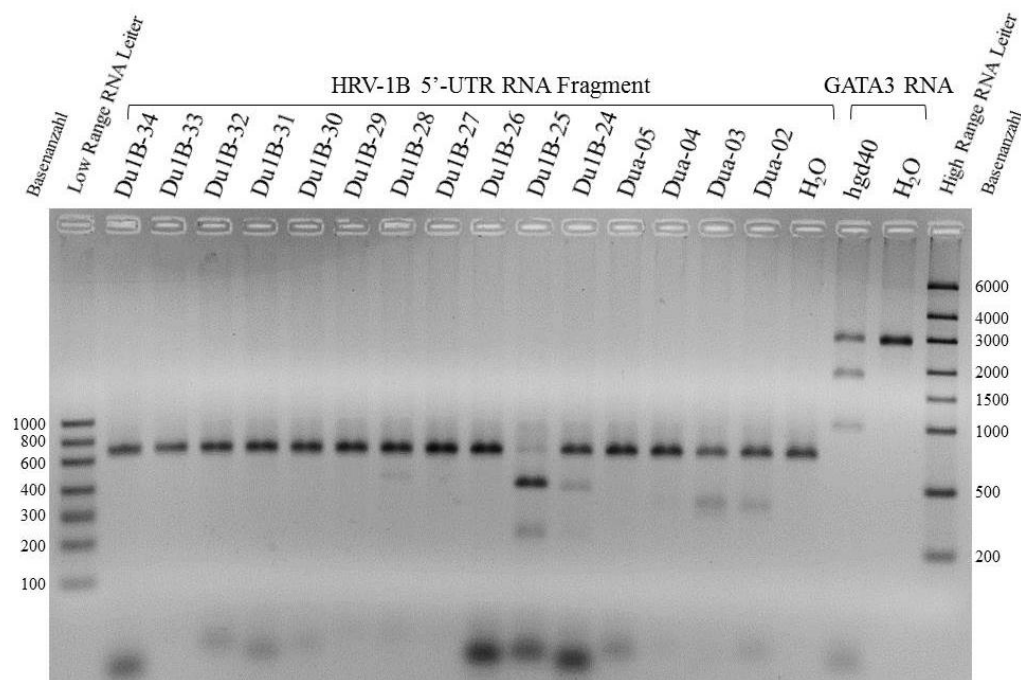
#### 3.1 *In vitro* Screening der Testregionen

Im ersten Schritt wurden DNAzyme spezifisch gegen alle theoretisch möglichen Zielsequenzen mit Guanin-Uracil (GU) Schnittstelle innerhalb der zwei Testbereiche auf der RNA der Testviren HRV-1B, -16 und -29 entwickelt. Dies umfasste 34 DNAzyme für die 5'-UTR von HRV-1B, 42 für die 5'-UTR von HRV-16 und 33 für die 5'-UTR von HRV-29. In der CRE Region der drei Testviren wurden 44 mögliche Schnittstellen für HRV-1B, 41 für HRV-16 und 32 für HRV-29 identifiziert und als Vorlage für die Herstellung von DNAzymen benutzt.

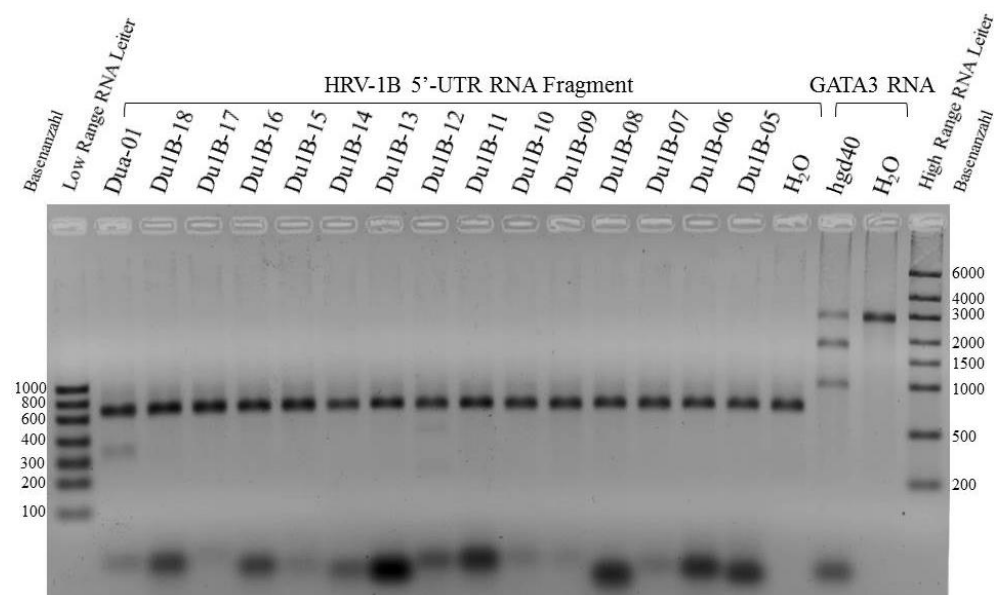
Darauf galt es alle entwickelten DNAzyme im Rahmen von Spaltungsprüfungen zu testen. Für diese Screening-Untersuchung auf schneidende Aktivität wurde jedes DNAzym mit der viralen Ziel-RNA unter standardisierten Bedingungen für eine Stunde inkubiert und danach durch Gelelektrophorese in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt.

In der 5'-UTR von HRV-1B zeigten insgesamt 8 (23,5%) von den 34 getesteten DNAzymen schneidende Aktivität (siehe Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10) – diese Aktivität

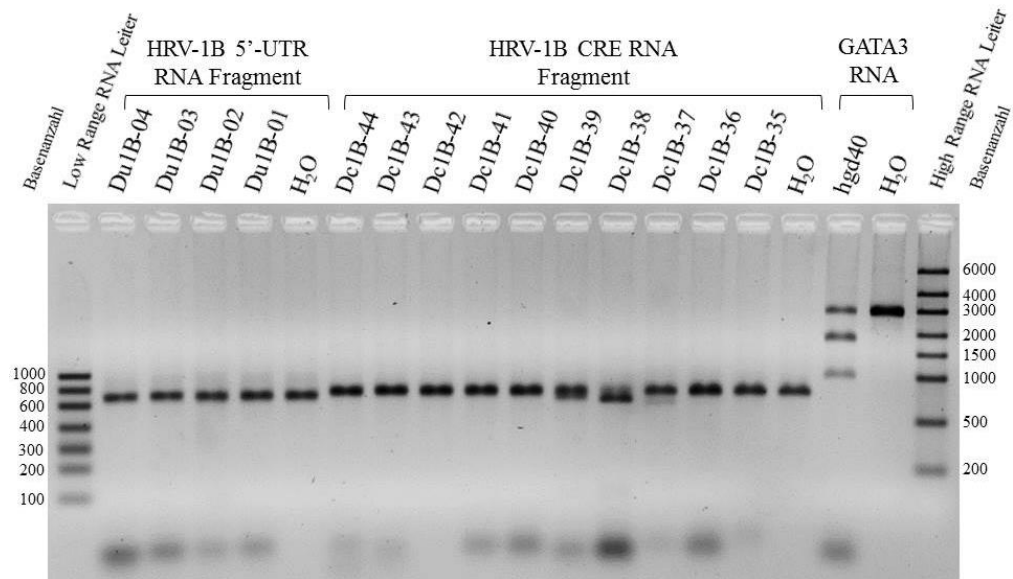
war im Falle von Du1B-26, Du1B-24, Dua-04, Dua-02, Dua-01 und Du1B-12 schwach, bei Dua-03 mäßig und bei Du1B-25 ausgezeichnet.



**Abb. 8** Screening HRV-1B 5'-UTR (Testung der DNAsyme Du1B-34 bis Dua-02); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

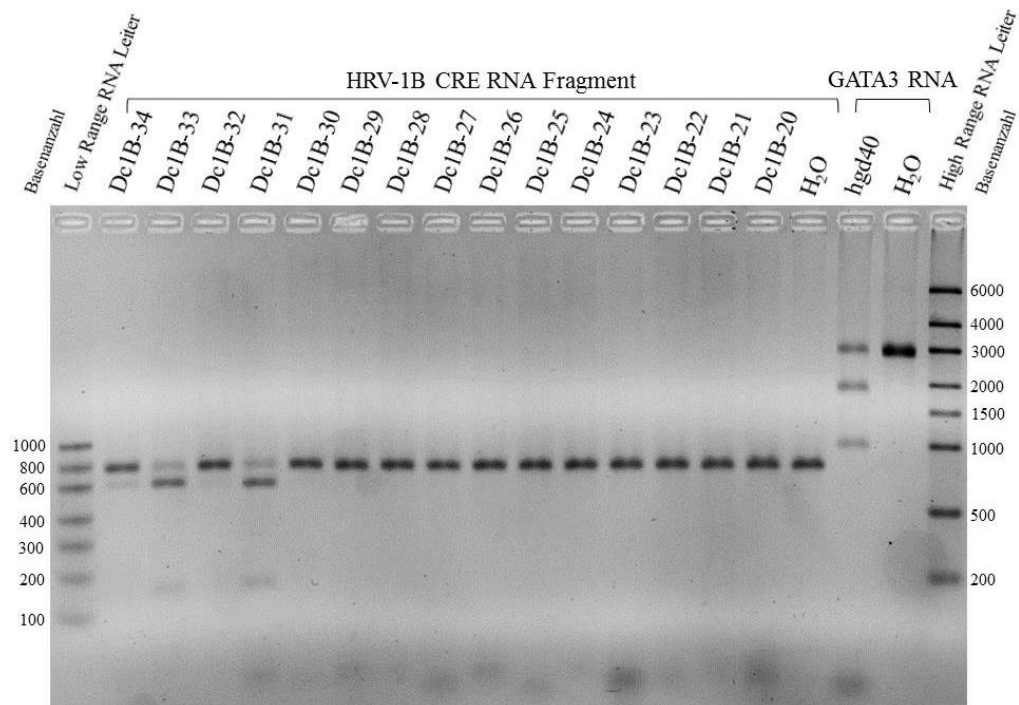


**Abb. 9** Screening HRV-1B 5'UTR (Testung der DNAsyme Dua-01 bis Du1B-05); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

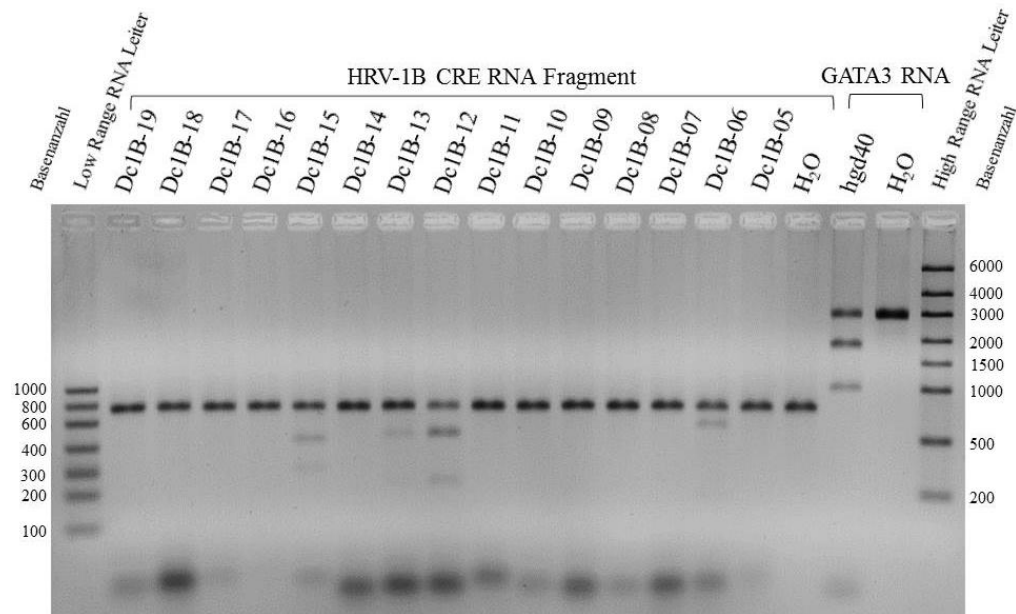


**Abb. 10 Screening HRV-1B 5'-UTR** (Testung der DNAzyme Du1B-04 bis Du1B-01); **Screening HRV-1B CRE Region** (Testung der DNAzyme Dc1B-44 bis Dc1B-35); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

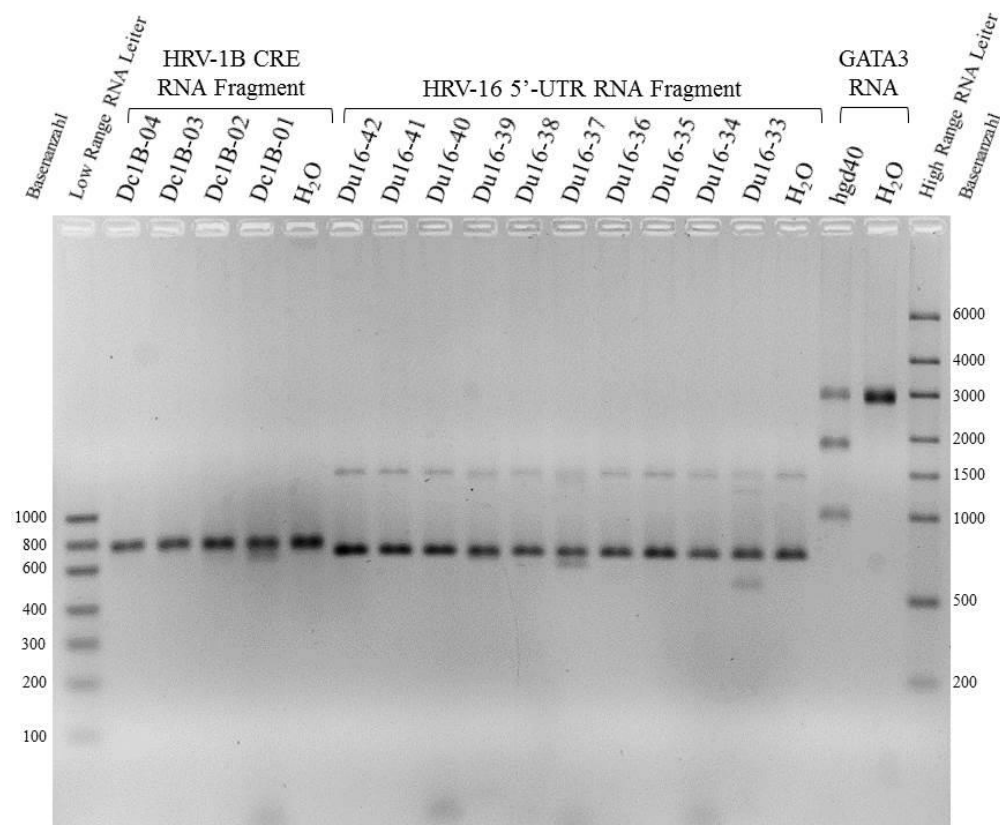
Insgesamt wiesen 12 (27,3%) der 44 getesteten DNAzyme in der HRV-1B CRE Region schneidende Aktivität auf (siehe Abb. 10, Abb. 11, Abb. 12 und Abb. 13). Bei Dc1B-37, Dc1B-34, Dc1B-32, Dc1B-15, Dc1B-13 und Dc1B-01 handelte es sich um schwache Aktivität. Die DNAzyme Dc1B-39, Dc1B-12 und Dc1B-06 zeigten mäßige und Dc1B-38, Dc1B-33 sowie Dc1B-31 starke Aktivität.



**Abb. 11 Screening HRV-1B CRE Region** (Testung der DNAzyme Dc1B-34 bis Dc1B-20); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 12 Screening HRV-1B CRE Region** (Testung der DNAsyme Dc1B-19 bis Dc1B-05); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

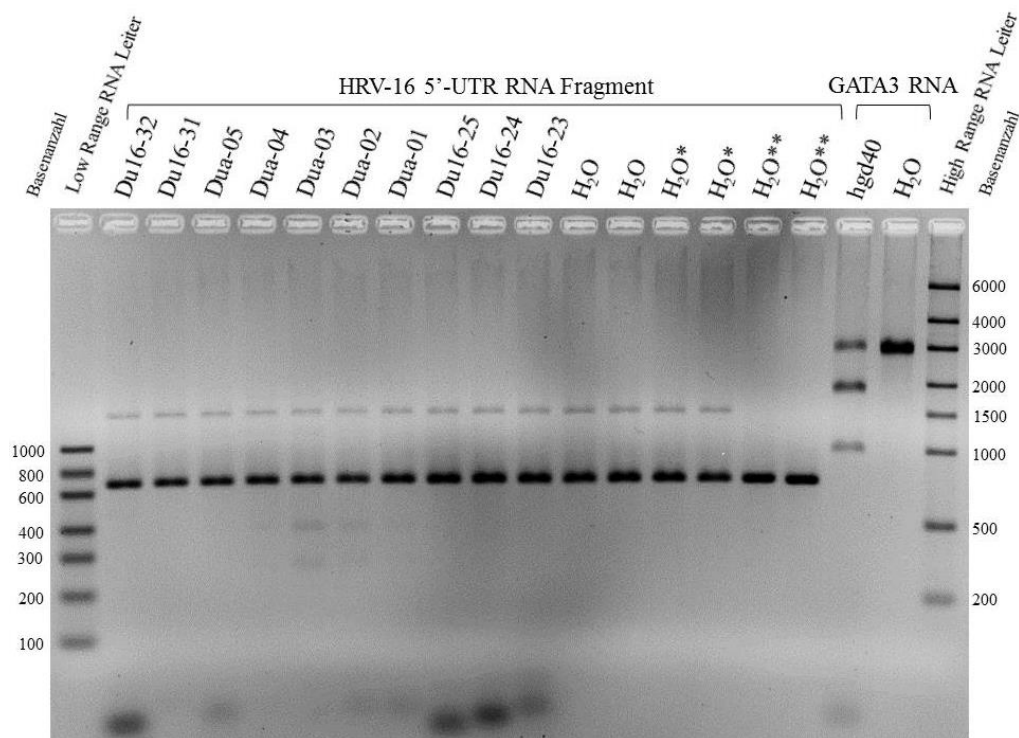


**Abb. 13 Screening HRV-1B CRE Region** (Testung der DNAsyme Dc1B-04 bis Dc1B-01);  
**Screening HRV-16 5'-UTR** (Testung der DNAsyme Du16-42 bis Du16-33); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

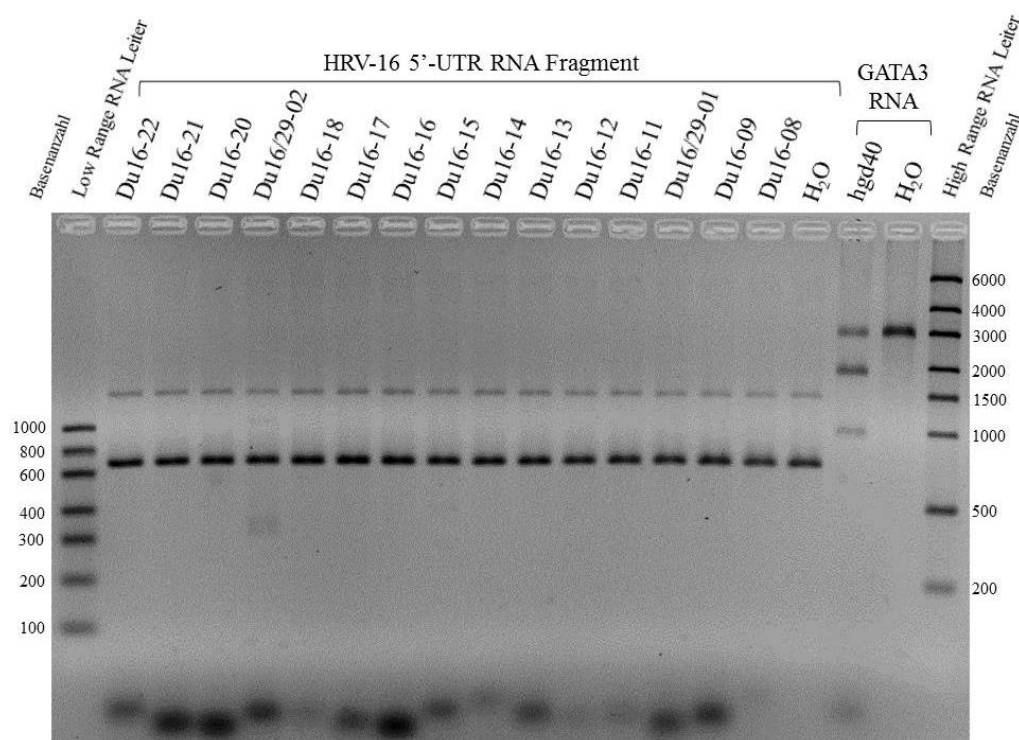
Von den 42 getesteten DNAsymen in der HRV-16 5'-UTR war bei insgesamt 9 (21,4%) schneidende Aktivität festzustellen (siehe Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16).



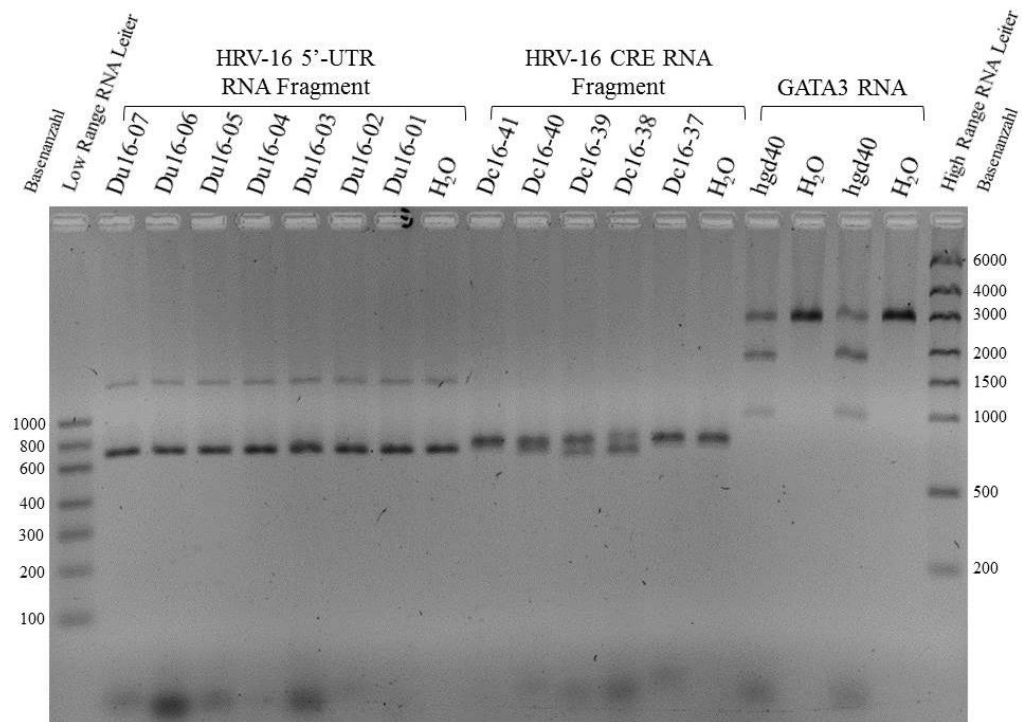
Dabei handelte es sich bei allen (Du16-37, Du16-33, Du16-32, Dua-04, Dua-03, Dua-02, Dua-01, Du16/29-02 und Du16-15) um schwache Aktivität.



**Abb. 14 Screening HRV-16 5'-UTR** (Testung der DNzyme Du16-32 bis Du16-23); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*Negativ-Kontrolle ohne Inkubationsschritt; \*\*Negativ-Kontrolle ohne Zugabe von TMN-Mix und ohne Inkubationsschritt

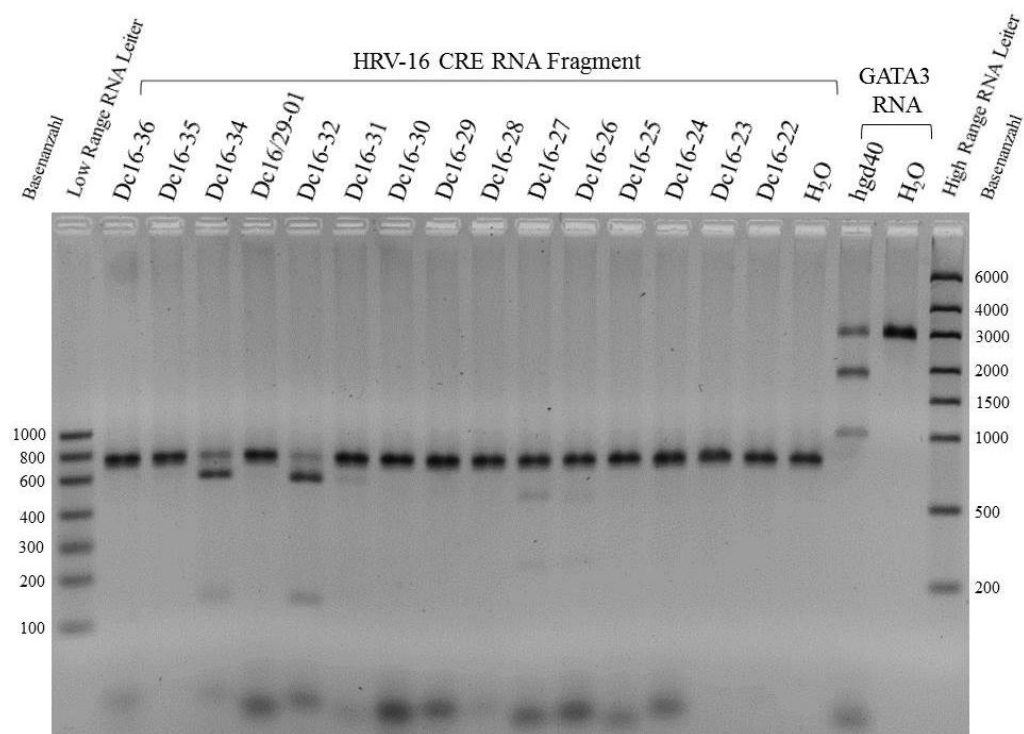


**Abb. 15 Screening HRV-16 5'-UTR** (Testung der DNzyme Du16-22 bis Du16-08); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

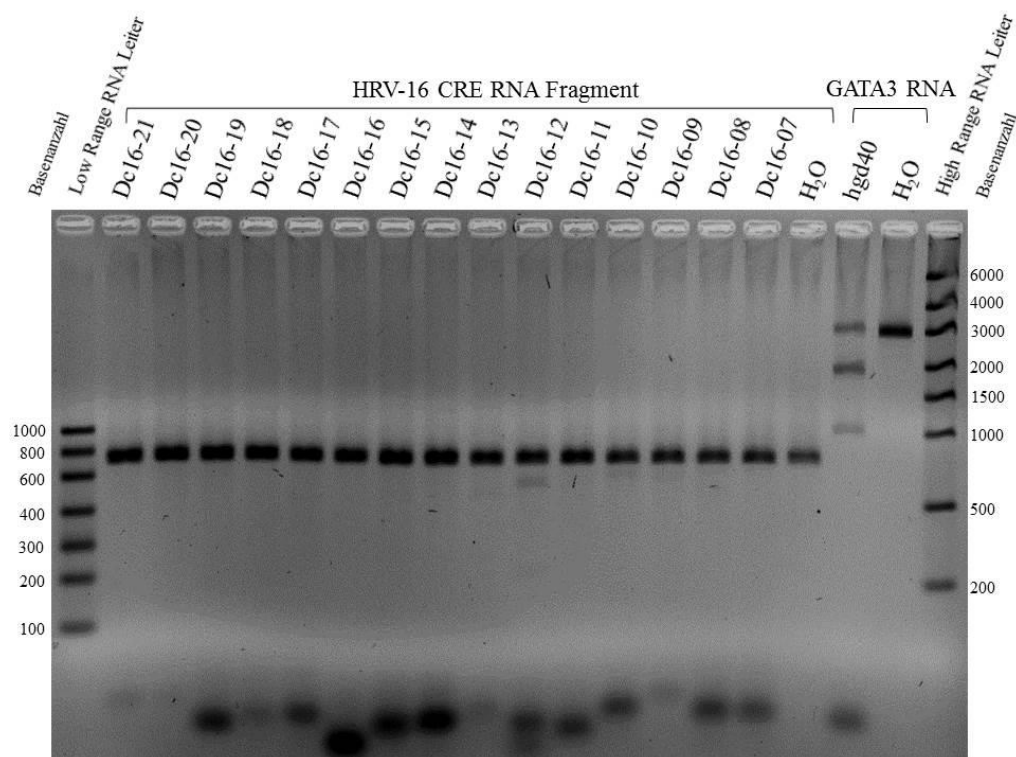


**Abb. 16** Screening HRV-16 5'-UTR (Testung der DNazyme Du16-07 bis Du16-01); Screening HRV-16 CRE Region (Testung der DNazyme Dc16-41 bis Dc16-37); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

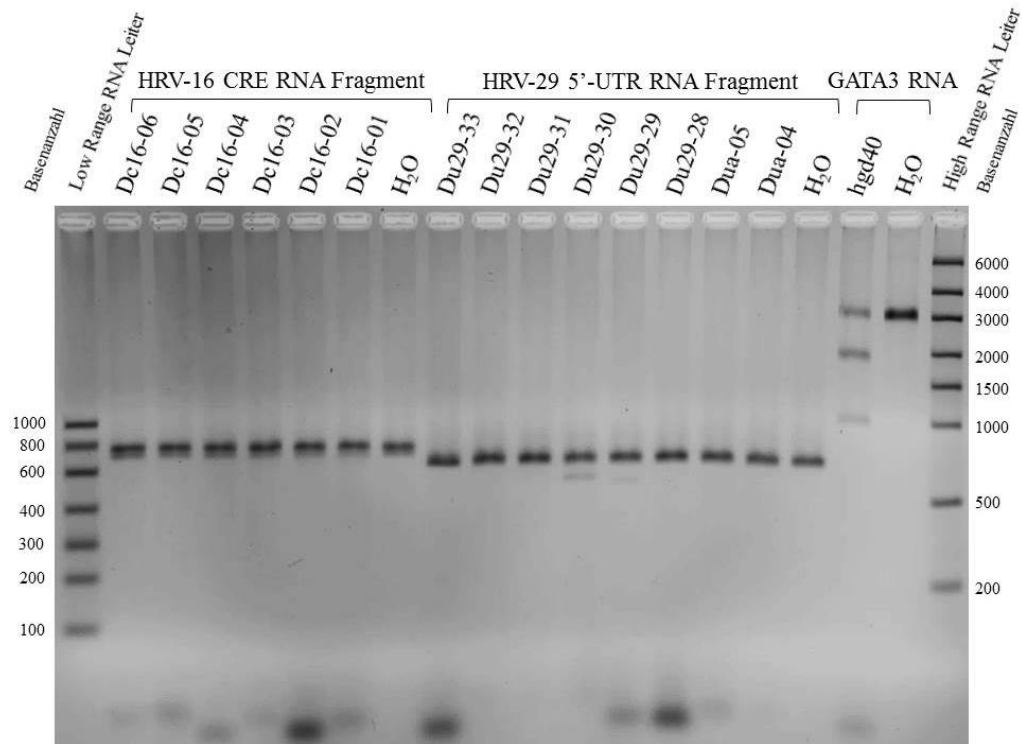
Insgesamt 12 (29,3%) der 41 getesteten DNazyme in der HRV-16 CRE Region wiesen schneidende Aktivität auf (siehe Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19), wobei es sich bei Dc16-31, Dc16-27, Dc16-26, Dc16-13, Dc16-12, Dc16-10 und Dc16-09 um schwache Aktivität handelte. Die DNazyme Dc16-40 und Dc16-39 hingegen zeigten mäßige, Dc16-38, Dc16-34 und Dc16-32 starke Aktivität.



**Abb. 17 Screening HRV-16 CRE Region** (Testung der DNzyme Dc16-36 bis Dc16-22); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

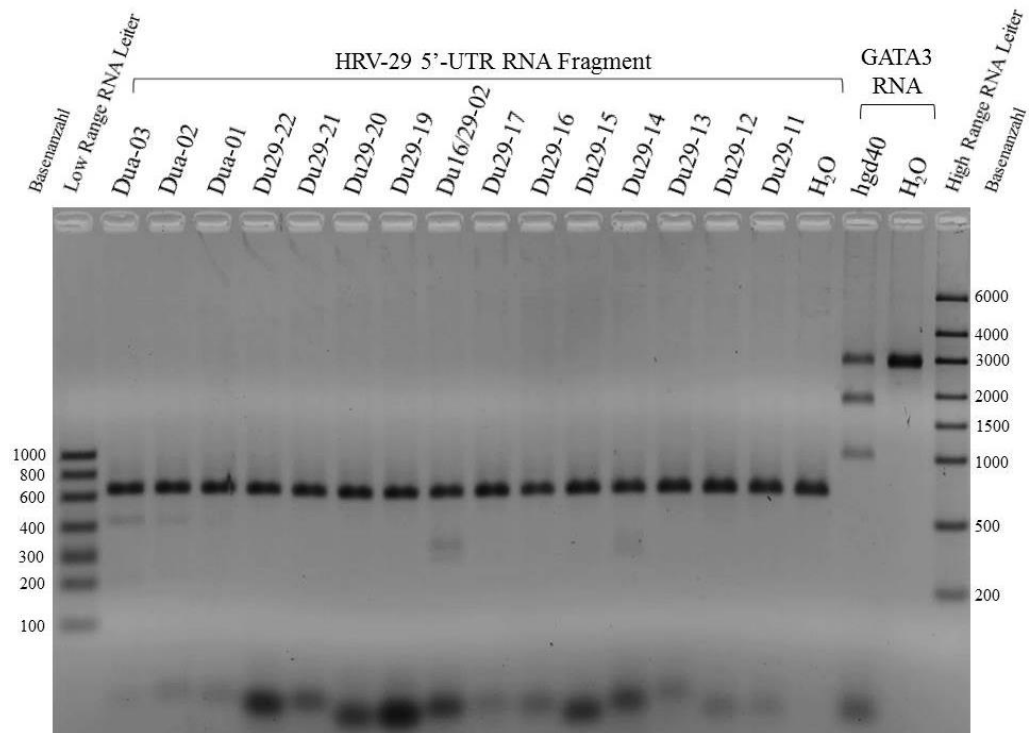


**Abb. 18 Screening HRV-16 CRE Region** (Testung der DNzyme Dc16-21 bis Dc16-07); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

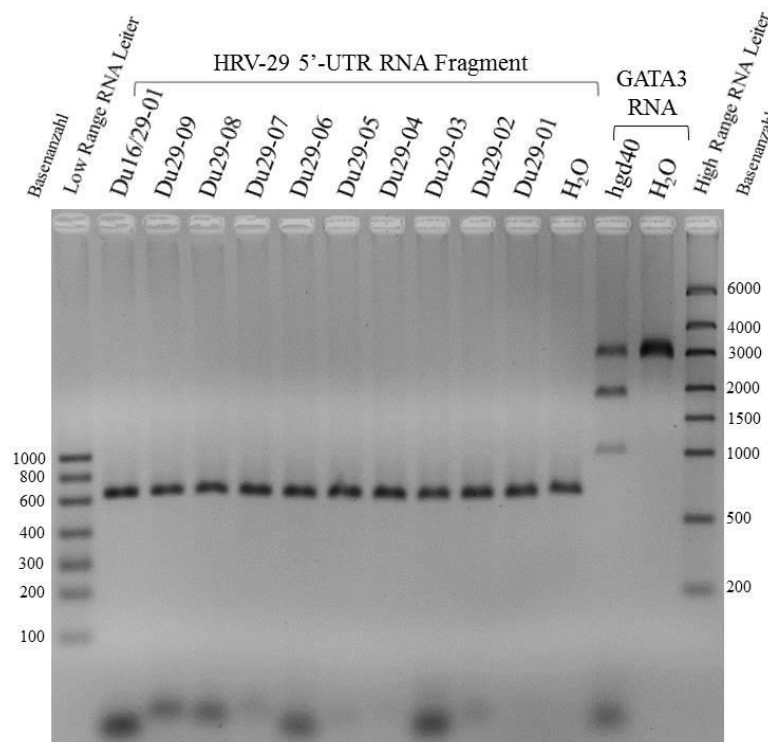


**Abb. 19 Screening HRV-16 CRE Region** (Testung der DNazyme Dc16-06 bis Dc16-01); **Screening HRV-29 5'-UTR** (Testung der DNazyme Du29-33 bis Dua-04); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAsym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

In der 5'-UTR von HRV-29 zeigten insgesamt 8 (24,2%) der 33 getesteten DNazyme schneidende Aktivität (siehe Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21). Dabei handelte es sich bei allen (Du29-30, Du29-29, Dua-04, Dua-03, Dua-02, Dua-01, Du16/29-02 und Du29-14) um schwache Aktivität.



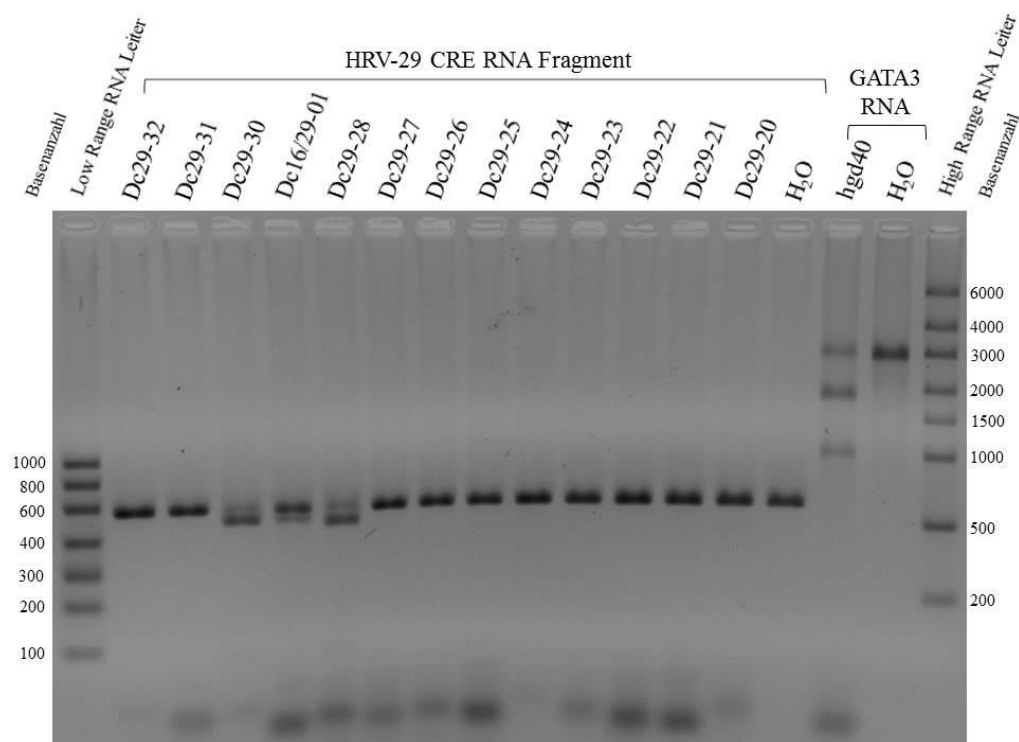
**Abb. 20 Screening HRV-29 5'-UTR** (Testung der DNAsyme Du29-03 bis Du29-11); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



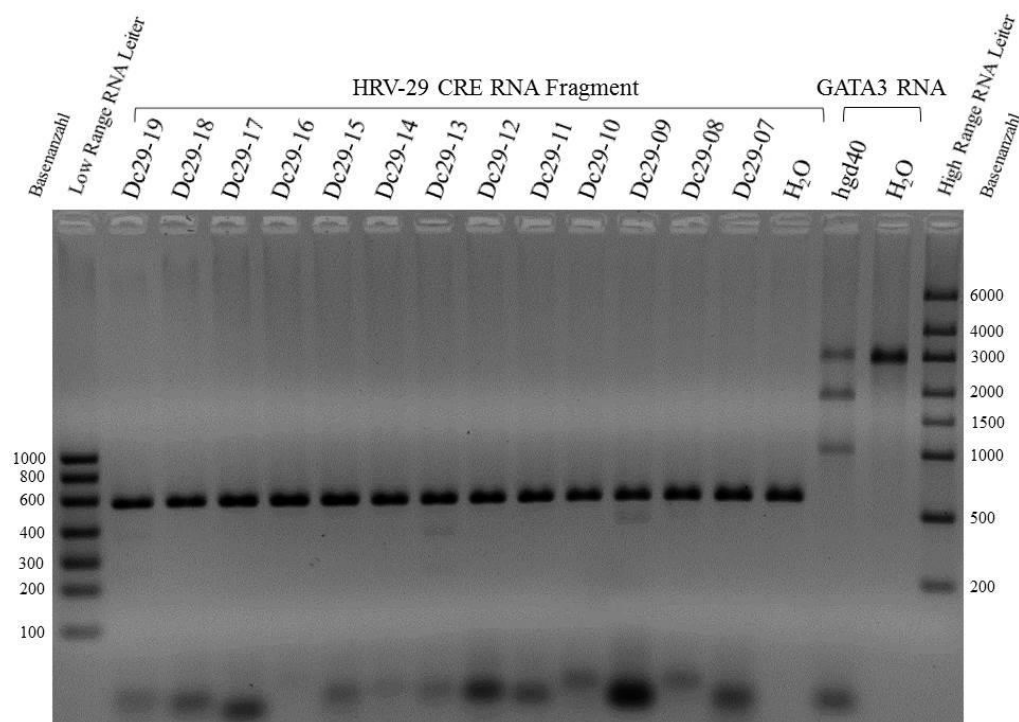
**Abb. 21 Screening HRV-29 5'-UTR** (Testung der DNAsyme Du16/29-01 bis Du29-01); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

Von den 32 getesteten DNAsyemen in der CRE Region von HRV-29 zeigten 12 (37,5%) schneidende Aktivität (siehe Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24). Während die DNAsyme Dc29-19, Dc29-13, Dc29-09, Dc29-08 und Dc29-02 schwache Aktivität zeigten,

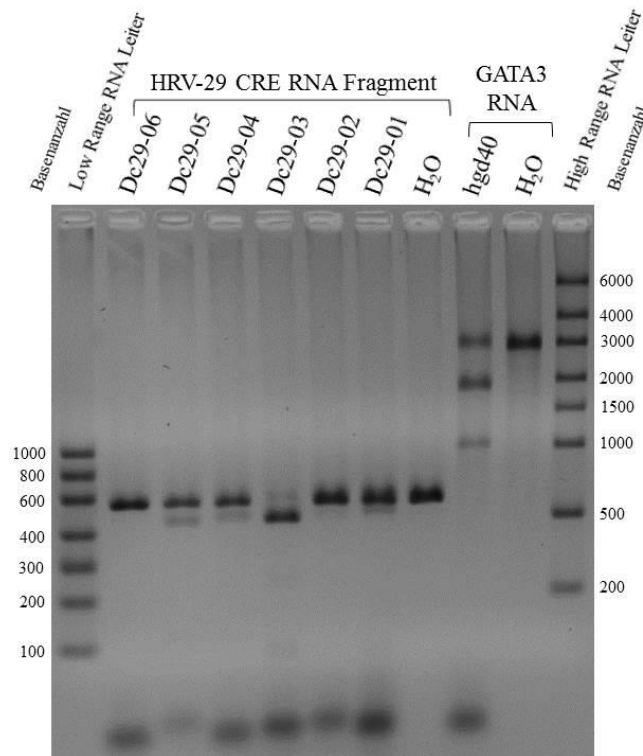
handelte es sich bei Dc16/29-01, Dc29-05, Dc29-04 und Dc29-01 um mäßige, bei Dc29-30 und Dc29-28 um starke und bei Dc29-03 um ausgezeichnete Aktivität.



**Abb. 22 Screening HRV-29 CRE Region** (Testung der DNzyme Dc29-32 bis Dc29-20); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 23 Screening HRV-29 CRE Region** (Testung der DNzyme Dc29-19 bis Dc29-07); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 24 Screening HRV-29 CRE Region** (Testung der DNzyme Dc29-06 bis Dc29-01); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

### 3.1.1 Phänomen einer zusätzlichen Bande bei Versuchen mit HRV-16 5'-UTR RNA Fragment

In der DNzym-Testung zeigten die Versuche mit dem RNA Fragment der HRV-16 5'-UTR die Ausbildung eines zusätzlichen Bandensignals im Bereich der Lauflänge einer Basenzahl von 1500. Dieses Signal war bei den Überprüfungsschritten der RNA-Herstellung nicht vorhanden. Es wurde vermutet, dass das Bandensignal auf Grund der Laufstrecke am ehesten durch eine Faltung oder Zusammenlagerung mehrerer RNA Fragmente entstand, welche nicht durch Zugabe des RNA Loading Buffers aufgelöst werden konnte. Dafür sprach insbesondere auch das Auftreten weiterer Bandensignale in Bereichen kürzerer Basenzahl bei Testung stark aktiver DNzyme, die auf eine Faltung oder Zusammenlagerung der entstandenen Spaltprodukte hinweisen (siehe Abb. 33). Um das Phänomen genauer zu untersuchen wurde die Reaktionsdurchführung testweise verändert (siehe Abb. 14). Als entscheidender Schritt für die Entstehung des Phänomens konnte die Zugabe des TNM-Mix identifiziert werden. Ohne diesen kam es nicht zur Ausbildung der zusätzlichen Bande, sodass von einer Interaktion des RNA Fragments mit Anteilen des TNM-Mix ausgegangen werden muss. Es wurde entschieden, die Versuche trotz des zusätzlichen Signals zu verwenden und auch weitere Versuche mit diesem RNA Fragment

durchzuführen, da keine Beeinflussung der Testung ersichtlich war und sich das Phänomen stabil in allen Versuchen zeigte.

### 3.2 Analyse der gefundenen Schnittstellen *in silico*

Anhand der erstellten Virusgenom-Datenbanken wurden die Genomsequenzen auf das Vorhandensein der zuvor entdeckten Schnittstellen und zugehörigen Zielsequenzen untersucht. Die detaillierten Ergebnisse dieser Untersuchung finden sich im Anhang zu dieser Arbeit (siehe Tab. 22 und Tab. 23). In den folgenden Tabellen (siehe Tab. 18 und Tab. 19) sind die Ergebnisse in übersichtlicher Form dargestellt. Die Schnittstellen auf der viralen RNA sind nach ihrer Position von 5'- nach 3'-Ende durchnummeriert. DNAzyme mit Schnittstellen an derselben Position im Genom, aber unterschiedlichen Sequenzen in den Substratbindungsdomänen durch Differenzen in der Genomsequenz der Testviren (Bsp.: Schnittstelle 1 in 5'-UTR), sind gemeinsam aufgeführt. Danach ist die beobachtete schneidende Aktivität aus den Screening-Experimenten mit dem jeweils passenden Testvirus angegeben. Es wurden in der Screening-Phase nur DNAzym-RNA Paarungen getestet, bei denen Bindungsdomänen und virale Zielsequenz vollständig komplementär zueinander waren. In der letzten Spalte finden sich Angaben zum prozentualen Anteil aller bekannten Virustypisolate, deren Genom die DNAzym-Zielsequenz enthält. Die Zahl bezieht sich immer auf alle aufgeführten DNAzyme einer Schnittstelle zusammen.

**Tab. 18** Analyse der schneidenden DNAzyme in der 5'-UTR

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *			Virustypisolate mit DNAzym-Zielsequenz**
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	
1	Du1B-12	+			44,92% (von 305 Isolaten)
	Du16-15		+		
	Du29-14			+	
2	Du16/29-02		+	+	45,31% (von 309 Isolaten)
3	Dua-01	+	+	+	98,39% (von 310 Isolaten)
4	Dua-02	+	+	+	98,06% (von 309 Isolaten)
5	Dua-03	++	+	+	27,74% (von 310 Isolaten)
6	Dua-04	+	+	+	27,74% (von 310 Isolaten)
7	Du1B-24	+			12,23% (von 319 Isolaten)
	Du16-32		+		
	Du29-29			+	
8	Du1B-25	++++			5,64% (von 319 Isolaten)
	Du16-33		+		
	Du29-30			+	
9	Du1B-28	+			1,57% (von 318 Isolaten)



Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *			Virustypisolate mit DNAzym-Zielsequenz**
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	
10	Du16-37		+		1,88% (von 319 Isolaten)

\* schwach (+); mäßig (++); stark (+++); ausgezeichnet (++++); keine (-)

\*\* Bei der Berechnung der angegebenen Werte wurden nur Virustypisolate berücksichtigt, deren Genomsequenz für den Bereich der DNAzym-Zielsequenz bekannt war. Dadurch unterscheidet sich die Anzahl der absolut berücksichtigten Isolate je nach getestetem DNAzym. Zur genauen Übersicht der abgedeckten Isolate siehe Tab. 22.

**Tab. 19 Analyse der schneidenden DNAzyme in der CRE Region**

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *			Virustypisolate mit DNAzym-Zielsequenz (Anteil aller 322 Isolate)**
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	
1	Dc1B-01	+			0,31%
2	Dc29-01			++	0,31%
3	Dc29-02			+	0,31%
4	Dc1B-06	++			2,17%
	Dc29-03			++++	
5	Dc16-09		+		1,24%
6	Dc16-10		+		1,24%
7	Dc29-04			++	0,31%
8	Dc16-12		+		1,24%
	Dc29-05			++	
9	Dc16-13		+		0,31%
10	Dc1B-12	++			0,31%
11	Dc1B-13	+			0,31%
12	Dc29-08			+	0,31%
13	Dc29-09			+	0,31%
14	Dc1B-15	+			0,31%
15	Dc29-13			+	0,31%
16	Dc29-19			+	2,17%
17	Dc16-26		+		0,31%
18	Dc16-27		+		0,31%
19	Dc16-31		+		1,86%
20	Dc1B-31	+++			7,45%
	Dc16-32		+++		
	Dc29-28			+++	
21	Dc1B-32	+			21,43%
	Dc16/29-01		-	++	
22	Dc1B-33	+++			9,01%
	Dc16-34		+++		
	Dc29-30			+++	
23	Dc1B-34	+			2,80%

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *			Virustypisolate mit DNAzym-Zielsequenz (Anteil aller 322 Isolate)**
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	
24	Dc1B-37	+			0,31%
25	Dc1B-38	+++			1,24%
	Dc16-38		+++		
26	Dc1B-39	++			0,93%
	Dc16-39		++		
27	Dc16-40		++		0,62%

\* schwach (+); mäßig (++); stark (+++); ausgezeichnet (++++); keine (-)

\*\* Aufgrund der unterschiedlichen und zum Teil ungeklärten Lokalisation der CRE Region in den verschiedenen HRV-Gruppen wurde bei der *in silico* Analyse darauf verzichtet, Virustypisolate ohne DNAzym-Zielsequenz auf die exakte Sequenzbeschaffenheit im fraglichen Genomabschnitt zu untersuchen. Dadurch blieben etwaige Sequenzlücken in einzelnen Isolaten unberücksichtigt und die angegebenen prozentualen Anteile beziehen sich auf alle 322 Virustypisolate. Zur genauen Übersicht der abgedeckten Isolate siehe Tab. 23.

Aus der *in silico* Analyse wurde ersichtlich, dass viele der gefundenen DNAzyme nicht in der Lage sind einen Anteil von mehr als 20 Prozent der bekannten Rhinoviren zu schneiden, da ihre Schnittstellen nur in einem kleinen Anteil von Virustypisolaten vorhanden sind. Diese Erkenntnis trifft auf alle DNAzyme mit Schnittstellen in der CRE Region – einzige Ausnahme bilden Dc1B-32 und Dc16/29-01 mit Schnittstelle 21 (siehe Tab. 19) – sowie auf die DNAzyme der Schnittstellen 7, 8, 9 und 10 in der 5'-UTR zu (siehe Tab. 18). Einige DNAzyme (Schnittstelle 21 in der CRE Region und Schnittstellen 1, 2, 5 und 6 in der 5'-UTR) zeigten mit 20 - 50 Prozent eine relevante Abdeckung von Virustypisolaten. Eine fast vollständige Abdeckung aller Virustypisolate zeigten nur die DNAzyme Dua-01 (98,39%) und Dua-02 (98,06%). Folglich konnte kein DNAzym gefunden werden, welches gleichzeitig starke schneidende Aktivität und eine ausreichende Abdeckung aller verschiedenen Virustypen bietet. Alle DNAzyme mit starker oder ausgezeichneter schneidender Aktivität zeigten unzureichende Abdeckung und die beiden DNAzyme mit ausgezeichneter Abdeckung aller bekannten Virustypisolate zeigten in allen Experimenten mit den Testviren nur schwache Aktivität.

### 3.2.1 Testung von neuen DNAzymen

Im Zuge der *in silico* Analyse wurde entdeckt, dass es sich bei dem Sequenzabschnitt im unmittelbaren Bereich der Schnittstelle 2 in der 5'-UTR ähnlich wie bei dem Sequenzabschnitt um die Schnittstellen 3, 4 und 5 (in der 5'-UTR) um extrem konservierte Bereiche handelt. Durch eine variable Base direkt in der Schnittstelle 2 können mit dem DNAzym Du16/29-02 nur 45,31 Prozent der Virustypisolate abgedeckt werden. Allerdings bildet das benachbarte Adenin-Uracil (AU) Basenpaar auch eine mögliche Schnittstelle für DNAzyme (siehe Abb. 29).

Es wurde entschieden, diese mögliche Schnittstelle (im Weiteren nummeriert als Schnittstelle 1.5) zu testen. Dafür wurden die zwei DNAzyme Du1B-AU und Du16/29-AU entworfen. Beide haben besagte Schnittstelle als Ziel, sie unterscheiden sich nur in einer Base innerhalb der Bindungsdomänen voneinander. Ihre Zielsequenzen sind in 98,06 Prozent aller Virustypisolate vorhanden.

Im ersten Versuch zeigte allerdings weder Du1B-AU noch Du16/29-AU schneidende Aktivität (siehe Abb. 28).

### **3.3 Suche nach Lösungsmöglichkeiten**

Zum Erreichen des gesetzten Ziels mussten die Eigenschaften der DNAzyme verbessert werden, um Kandidaten zu finden, die gleichzeitig ausreichend starke schneidende Aktivität zeigen und durch ihre Zielsequenz den Großteil der Virustypen abdecken können. Dazu wurden folgende Lösungsmöglichkeiten und Strategien überlegt:

#### **3.3.1 Kreuz-Aktivität von starken DNAzymen**

Es sollte geprüft werden, ob stark aktive DNAzyme auch in der Lage sind, nicht komplett komplementäre Zielsequenzen zu binden und zu zerschneiden, um somit eine größere Anzahl von Virustypen abzudecken. Geeignet für diese Untersuchungen schienen die DNAzyme mit starker oder ausgezeichneter schneidender Aktivität aus den Screening-Untersuchungen. In der CRE Region waren mehrere Kandidaten mit solchen Eigenschaften gefunden worden (Schnittstellen 4, 20, 22 und 25, siehe Tab. 19), während sich in der 5'-UTR die Schnittstelle 8 für eine Untersuchung eignete (siehe Tab. 18).

Durch das gezielte Design der DNAzyme anhand der Virusgenomsequenzen sind die DNAzyme an den genannten Schnittstellen nur spezifisch für den jeweiligen, in ihrem Entwurf berücksichtigten Testvirus, da die anderen Testviren an diesen Stellen einzelne abweichende Basen aufweisen. So war es möglich, neben der Reaktion mit dem eigentlichen Zielvirus, ebenso auf Kreuz-Aktivität mit den beiden weiteren Testviren zu testen.


Je nach Heterogenität der Testviren im Bereich der Schnittstellen enthielten die Bindungssequenzen auf der viralen RNA durch die abweichenden Basen zwischen 1 und 4 unpassenden Basen zu den Bindungsdomänen der DNAzyme. Die folgende Grafik (siehe Abb. 25) zeigt, am Beispiel der Schnittstelle 20 in der CRE Region, schematisch die Reaktionspaarungen aus den Screening Versuchen sowie die zusätzlichen Reaktionspaarungen mit unpassenden Basen bei Testungen auf Kreuz-Reaktivität mit den weiteren Testviren.

**Ursprüngliches Design und  
Reaktionspaarungen aus  
Screening Untersuchungen:**

HRV-1B CRE Fragment	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCUGGUG - 3'
HRV-16 CRE Fragment	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'
HRV-29 CRE Fragment	5' - UGA <b>AAGGGCCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'

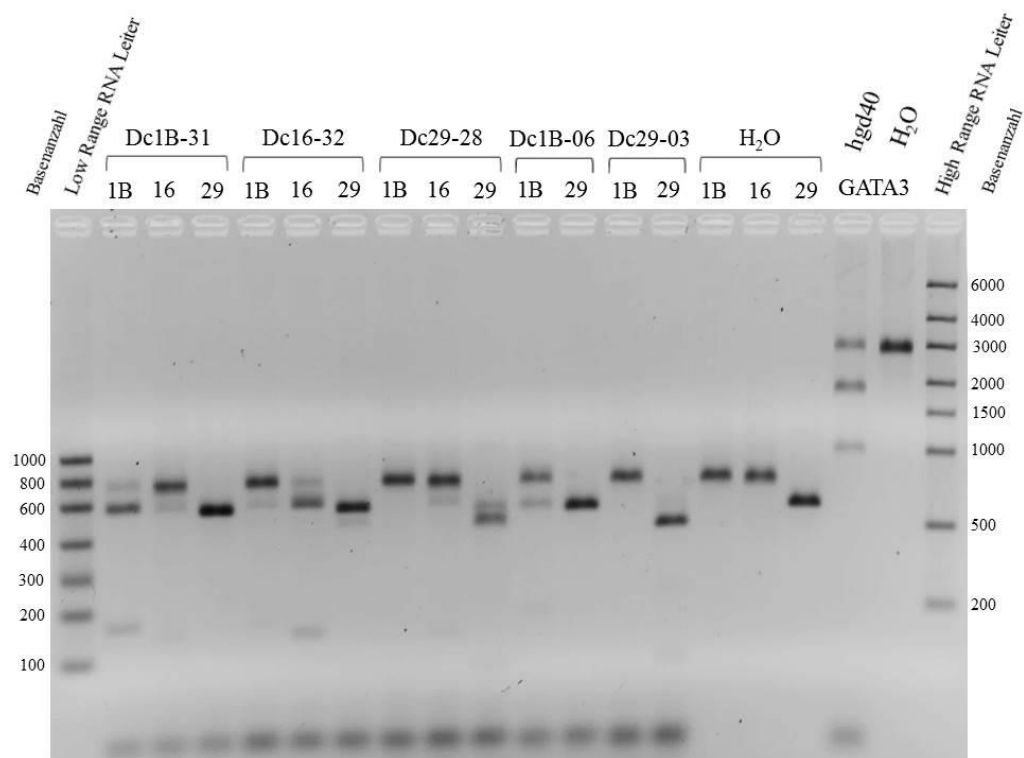
**Reaktionspaarungen zur  
Untersuchung auf Kreuz-Aktivität:**

HRV-1B	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCUGGUG - 3'
HRV-16	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACC <b>AGG</b> UG - 3'
HRV-29	5' - UGA <b>AAGGGCCAUGUGA</b> ACC <b>AGG</b> UG - 3'
HRV-1B	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACC <b>UGG</b> UG - 3'
HRV-16	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'
HRV-29	5' - UGA <b>AAGGGCCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'
HRV-1B	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCUGGUG - 3'
HRV-16	5' - UGA <b>AAGGACCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'
HRV-29	5' - UGA <b>AAGGGCCAUGUGA</b> ACCAGGUG - 3'

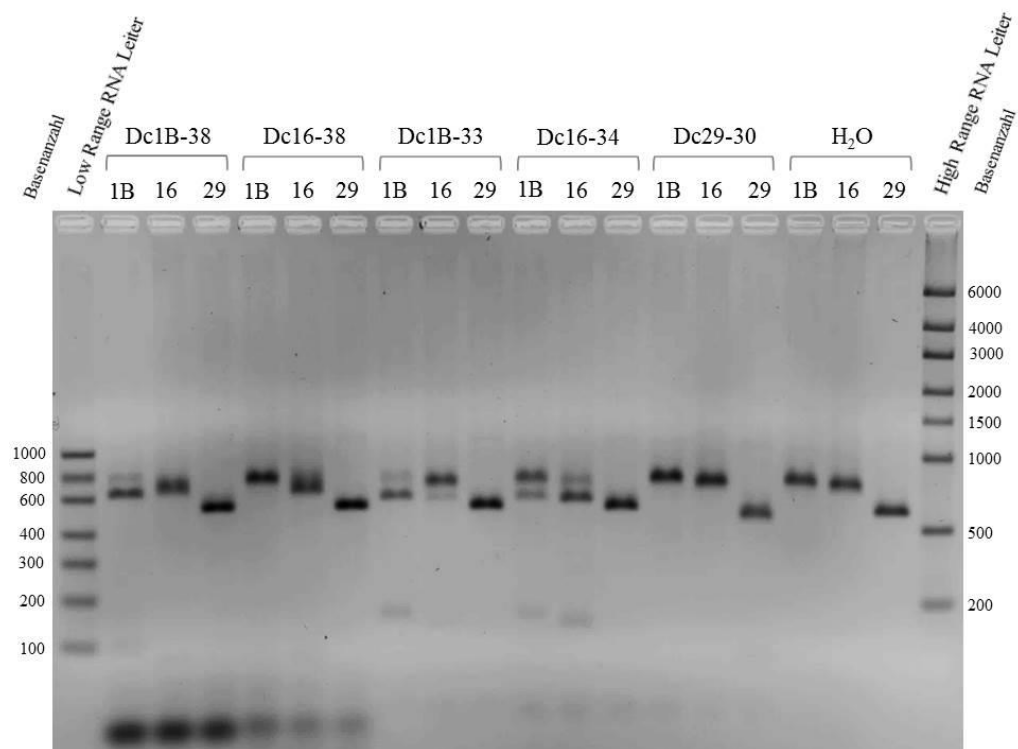
 = Symbol für DNAzym

**Abb. 25 Schematische Darstellung für die Testung der Kreuz-Aktivität am Beispiel von Schnittstelle 20 in der CRE Region:** Die DNAzyme Dc1B-31 (blau), Dc16-32 (gelb) und Dc29-28 (grau) mit den Zielsequenzen auf den Virus-RNA Fragmenten mit Bindungssequenzen (fett gedruckt), Schnittstelle (grün), unpassende Basen zu den Bindungsdomänen des DNAzyms (rot)

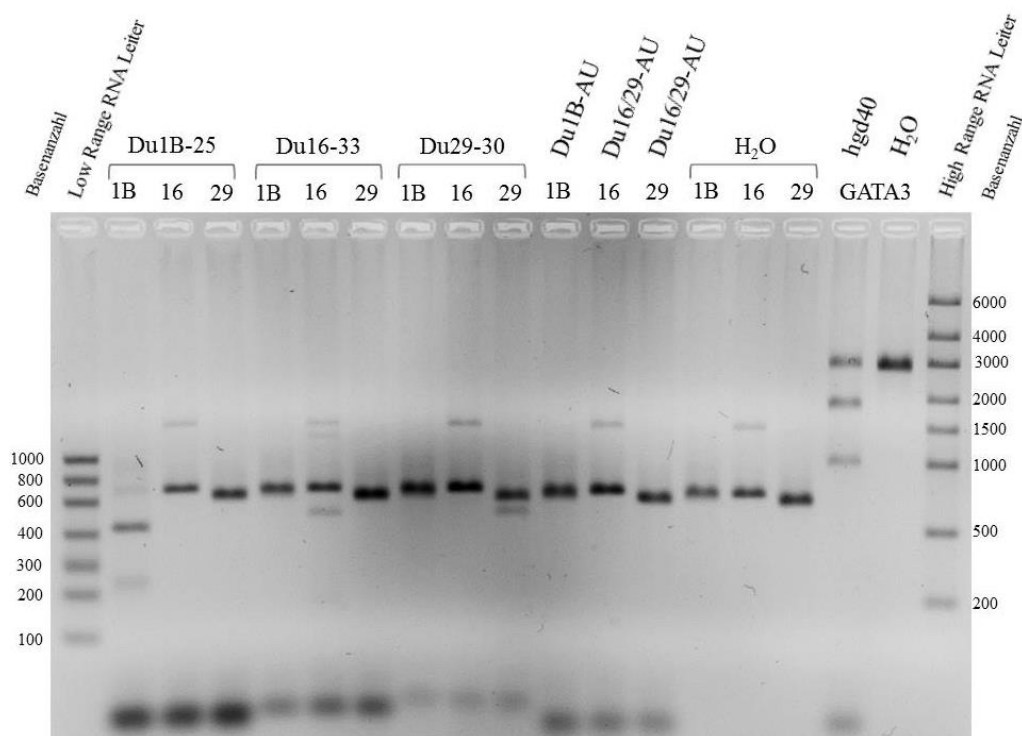
Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Testung auf Kreuz-Aktivität folgen als Bilder (siehe Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28) der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Produkte der Spaltungsprüfungen.



**Abb. 26** **Testung auf Kreuz-Aktivität in der CRE Region** (Testung der DNAzyme Dc1B-31, Dc16-32 und Dc29-28 an Schnittstelle 20; Testung der DNAzyme Dc1B-06 und Dc29-03 an Schnittstelle 4); 150 ng Virus-RNA und 30 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 27** **Testung auf Kreuz-Aktivität in der CRE Region** (Testung der DNAzyme Dc1B-38 und Dc16-38 an Schnittstelle 25; Testung der DNAzyme Dc1B-33, Dc16-34 und Dc29-30 an Schnittstelle 22); 150 ng Virus-RNA und 30 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 28** Testung auf Kreuz-Aktivität in der 5'-UTR und Screening von DNAzymen Du1B-AU und Du16/29-AU (Testung der DNAzyme Du1B-25, Du16-33 und Du29-30 an Schnittstelle 8; Testung von Du1B-AU und Du16/29-AU); 150 ng Virus-RNA und 30 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

Es zeigte sich, dass die DNAzyme in der Lage waren auch nicht komplett komplementäre Virussequenzen zu erkennen und zu schneiden. Allerdings war dies nur möglich solange sich die Bindungssequenz lediglich in einer einzigen Base von der eigentlichen Zielsequenz unterschied. Gleichzeitig war die Aktivität des DNAzyms bei unpassender Zielsequenz in allen Fällen deutlich schwächer als bei komplett komplementärer Reaktionspaarung. Die folgenden Tabellen (siehe Tab. 20 und Tab. 21) geben eine Übersicht über die beobachtete Aktivität der DNAzyme gegen die verschiedenen Testviren und enthalten zusätzlich Angaben über die Anzahl der unpassenden Basen zu den Bindungsdomänen des verwendeten DNAzyms.

**Tab. 20** Kreuz-Aktivität von DNAzymen in der CRE Region

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *:			Anzahl der unpassenden Basen zu den Bindungsdomänen des DNAzyms		
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	HRV-1B	HRV-16	HRV-29
4	Dc1B-06	++	-	-	0	2	2
	Dc29-03	-	-	++++	2	4	0
20	Dc1B-31	+++	+	-	0	1	2
	Dc16-32	+	+++	+	1	0	1
	Dc29-28	-	+	+++	2	1	0
22	Dc1B-33	+++	+	-	0	1	3
	Dc16-34	++	+++	-	1	0	2

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *:			Anzahl der unpassenden Basen zu den Bindungsdomänen des DNAzyms		
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	HRV-1B	HRV-16	HRV-29
25	Dc29-30	-	-	++++	3	2	0
	Dc1B-38	+++	-	-	0	1	3
	Dc16-38	-	+++	-	1	0	2

\* schwach (+); mäßig (++); stark (+++); ausgezeichnet (++++); keine (-)

**Tab. 21 Kreuz-Aktivität von DNAzymen in der 5'-UTR**

Schnittstelle	DNAzym	Schneidende Aktivität <i>in vitro</i> *:			Anzahl der unpassenden Basen zu den Bindungsdomänen des DNAzyms		
		HRV-1B	HRV-16	HRV-29	HRV-1B	HRV-16	HRV-29
8	Du1B-25	++++	-	-	0	3	3
	Du16-33	-	+	-	3	0	3
	Du29-30	-	-	+	3	3	0

\* schwach (+); mäßig (++); stark (+++); ausgezeichnet (++++); keine (-)

Bei *in silico* Überprüfung der erneut getesteten Schnittstellen wurde ersichtlich, dass die Sequenzvariabilität in den entsprechenden Genomabschnitten zu groß ist, um durch Kreuz-Aktivität der DNAzyme eine bedeutend umfassendere Abdeckung der Virustypen zu erreichen.

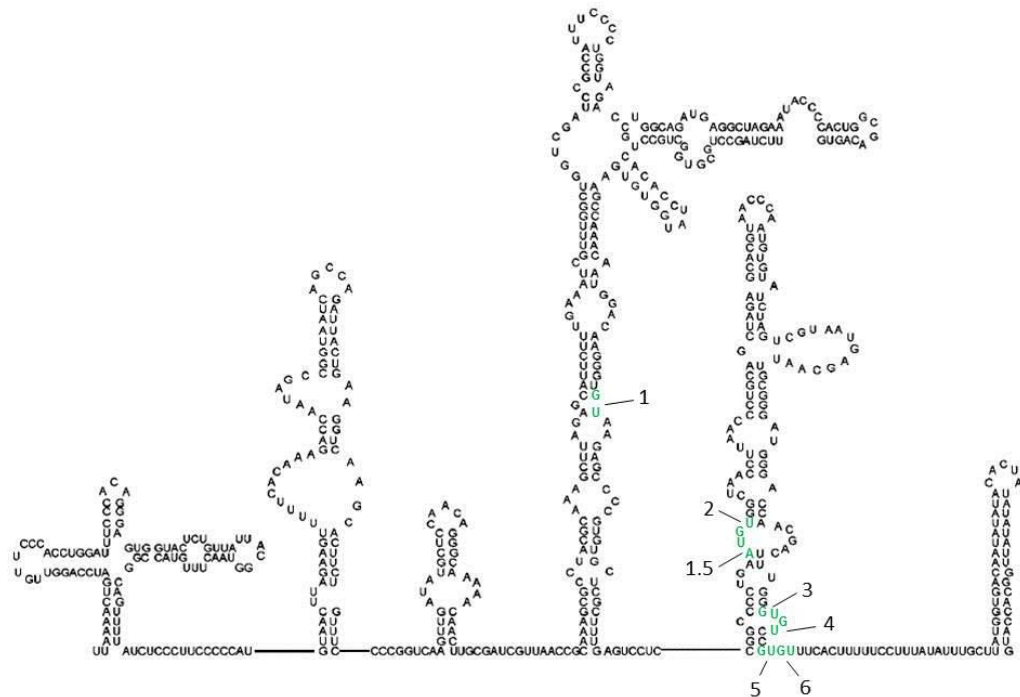
### 3.3.2 Testung von Längenvarianten

Während der *in silico* Analyse wurde festgestellt, dass es sich bei den Sequenzabschnitten in der 5'-UTR in unmittelbarer Nähe der Schnittstellen 3 und 4 um extrem hoch konservierte Bereiche handelt, deren Sequenz dadurch auf fast allen Virustypisolaten vorliegt (siehe Tab. 18 und Abschnitt 3.2.1).

Bei genauerer Betrachtung dieser Sequenzabschnitte zeigte sich, dass sie sehr wahrscheinlich in allen Virustypen Teile einer komplexen Sekundärstruktur ausbilden, einer Stamm-Schlaufen Subdomäne, beispielhaft dargestellt für HRV-2 in Abb. 29. Diese Sekundärstruktur stellt eine Behinderung für die Bindung fremder Moleküle dar und könnte dadurch die Aktivität der DNAzyme in dieser Region vermindern.

Es wurde versucht über Variation in der Länge der Bindungsdomänen die Eigenschaften der DNAzyme für diese Bereiche zu verbessern. Die Überlegungen basierten dabei auf der Hypothese, dass nur solche DNAzyme katalytische Aktivität entwickeln können, die in der Lage sind die vorliegende Sekundärstruktur aufzubrechen. Durch eine Verlängerung der Bindungsdomänen, mit Zielsequenzen innerhalb der Stamm-Schlaufen-Subdomäne, müssten die Van-der-Waals-Basenpaarungen zwischen DNAzym und Ziel-RNA stärker werden und dadurch besser mit den intramolekularen

Basenpaarungen der Sekundärstruktur konkurrieren können. Gleichzeitig könnte eine Bindungsdomäne mit Zielsequenz in einem ungepaarten Abschnitt, am ehesten außerhalb der Stamm-Schlaufen-Subdomäne, für die initiale Erkennung und Anlagerung an die Zielstruktur wichtig sein.

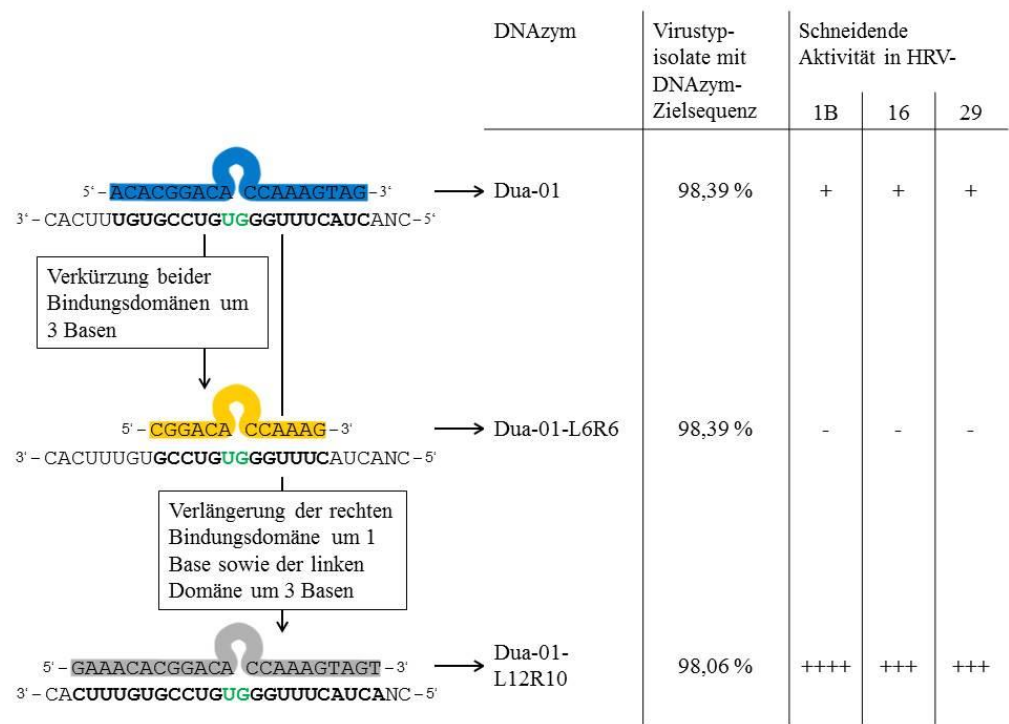


**Abb. 29** Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von HRV-2 in der 5'-UTR mit den markierten Schnittstellen der schneidenden DNAsen: Schnittstellen in grün nummeriert (siehe Tab. 18), Schnittstelle 1.5 markiert das Ziel für die DNAsen Du1B-AU und Du16/29-AU (modifiziert nach Anderson et al. 2007a)

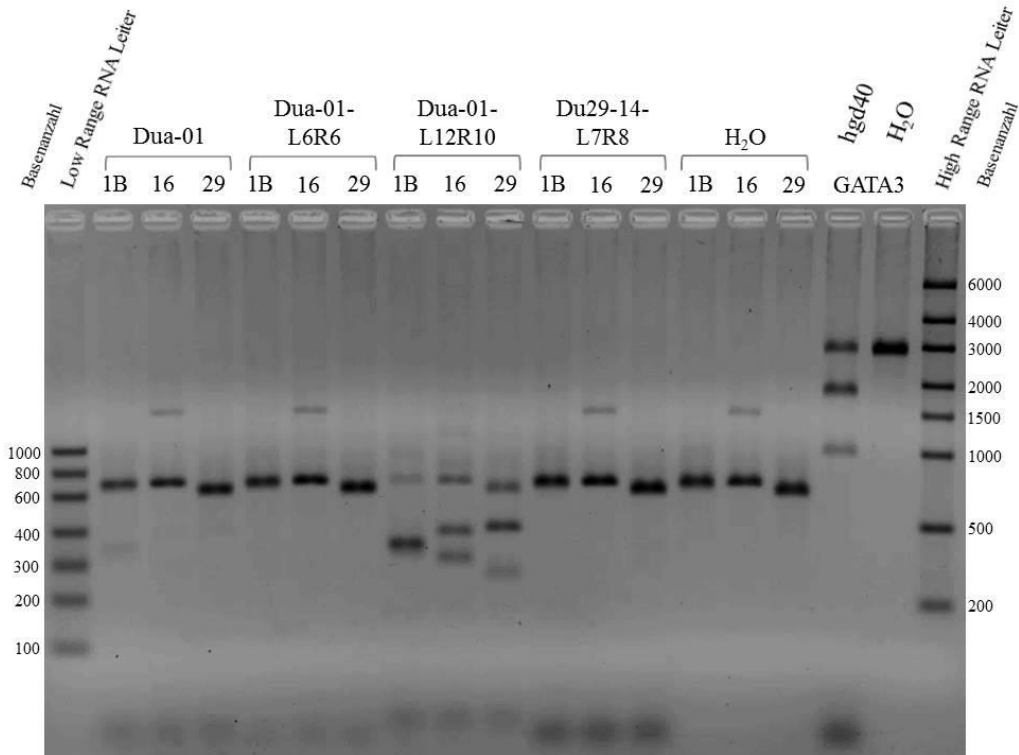
### 3.3.2.1 Längenvariation von Dua-01

Das DNAsym Dua-01 deckt durch die Lage seiner Zielsequenz innerhalb des hoch konservierten Abschnitts auf der Virus-RNA 98,39 Prozent aller Virustypisolate ab. Die Schnittstelle dieses DNAsyms (3) liegt bereits innerhalb der Stamm-Schleifen-Subdomäne. Dadurch befindet sich die Zielsequenz der rechten Bindungsdomäne komplett innerhalb der Stamm-Schleifen-Subdomäne, die Zielsequenz der linken Bindungsdomäne mit 6 Basen innerhalb und mit 3 Basen außerhalb. In der *in vitro* Testung zeigte Dua-01 schwache Aktivität. Eine verkürzte Version, Dua-01-L6R6, war, in Übereinstimmung mit den Überlegungen, deutlich schwächer und wies keine feststellbare Aktivität auf. Hingegen konnte durch eine Verlängerung beider Bindungsdomänen auf die maximal mögliche Länge ohne relevanten Verlust der Abdeckung von Virustypisolaten - eine Base an der rechten und drei Basen an der linken Bindungsdomäne - die Aktivität deutlich gesteigert werden (siehe Abb. 30 und Abb. 31).








**Abb. 30** Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-01 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität: Die DNAzyme Dua-01 (blau), Dua-01-L6R6 (gelb) und Dua-01-L12R10 (grau) mit den Zielsequenzen auf den Virus-RNA Fragmenten mit Bindungssequenzen (fett gedruckt) und Schnittstelle (grün), Schneidende Aktivität: schwach (+), mäßig (++), stark (+++), ausgezeichnet (++++)



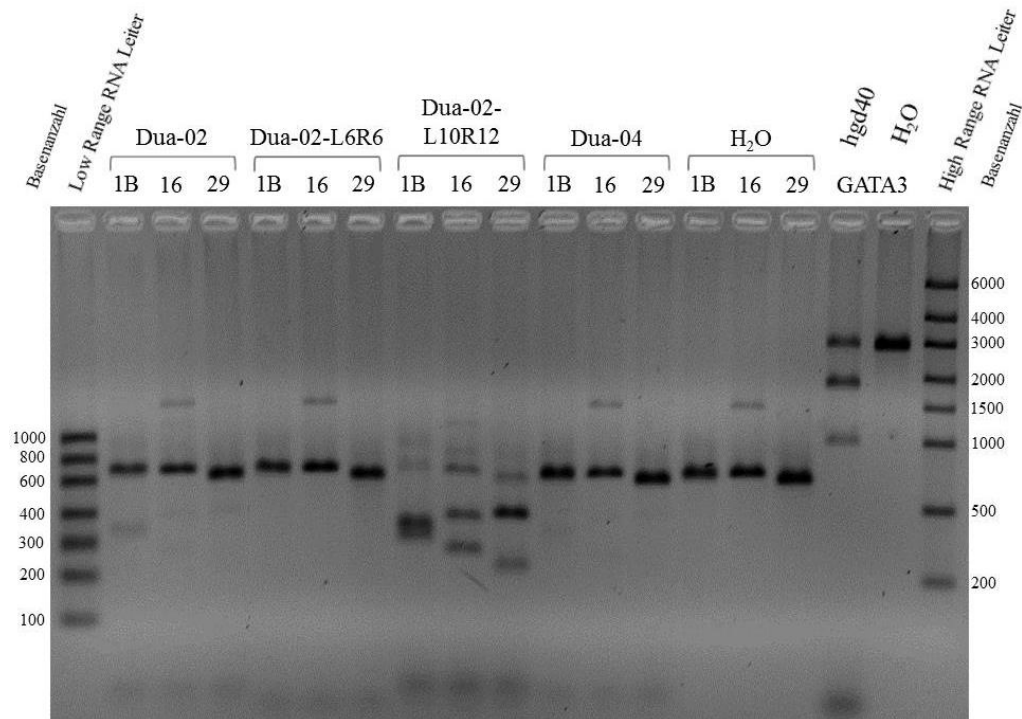
**Abb. 31** Testung von Längenvarianten des DNAzyms Dua-01; 30 pmol des untersuchten DNAzyms (Dua-01, Dua-01-L6R6, Dua-01-L12R10 und Du29-14-L7R8) mit 150 ng Virus-RNA (5'-UTR der Testviren HRV-1B, -16 und -29) pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

### 3.3.2.2 Längenvariation von Dua-02

Das DNAzym Dua-02 deckt durch die Lage seiner Zielsequenz innerhalb des hoch konservierten Abschnitts auf der Virus-RNA 98,06% aller Virustypisolate ab. Seine Schnittstelle (4) liegt innerhalb der Stamm-Schlaufen-Domäne, sodass die Zielsequenz der rechten Bindungsdomäne komplett innerhalb, die Zielsequenz der linken Bindungsdomäne mit 4 Basen innerhalb und mit 5 Basen außerhalb dieser Sekundärstruktur liegt. In der *in vitro* Testung zeigte Dua-02 schwache Aktivität. Eine verkürzte Version, Dua-02-L6R6, war, in Übereinstimmung mit den Überlegungen, deutlich schwächer und zeigte keine feststellbare Aktivität. Hingegen konnte durch eine Verlängerung beider Bindungsdomänen auf die maximal mögliche Länge ohne relevanten Verlust der Abdeckung von Virustypisolaten - drei Basen an der rechten und eine Base an der linken Bindungsdomäne - die Aktivität deutlich gesteigert werden (siehe Abb. 32 und Abb. 33).

DNAzym	Virustyp- isolate mit DNAzym- Zielsequenz	Schneidende Aktivität in HRV-		
		1B	16	29
 5'-AAACACGGG ACCCAAAGT-3' → Dua-02 3'-CACUUUGUGCCUGUGGGUUUCAUCANC-5'	98,06 %	+	+	+
Verkürzung beider Bindungsdomänen um 3 Basen   5'-CACGGA ACCCAA-3' → Dua-02-L6R6 3'-CACUUUGUGCCUGUGGGUUUCAUCANC-5'	98,39 %	-	-	-
Verlängerung der rechten Bindungsdomäne um 3 Basen sowie der linken Domäne um 1 Base   5'-GAAACACGGG ACCCAAAGTAGT-3' → Dua-02- L10R12 3'-CACUUUGUGCCUGUGGGUUUCAUCANC-5'	98,06 %	++++	+++	++++

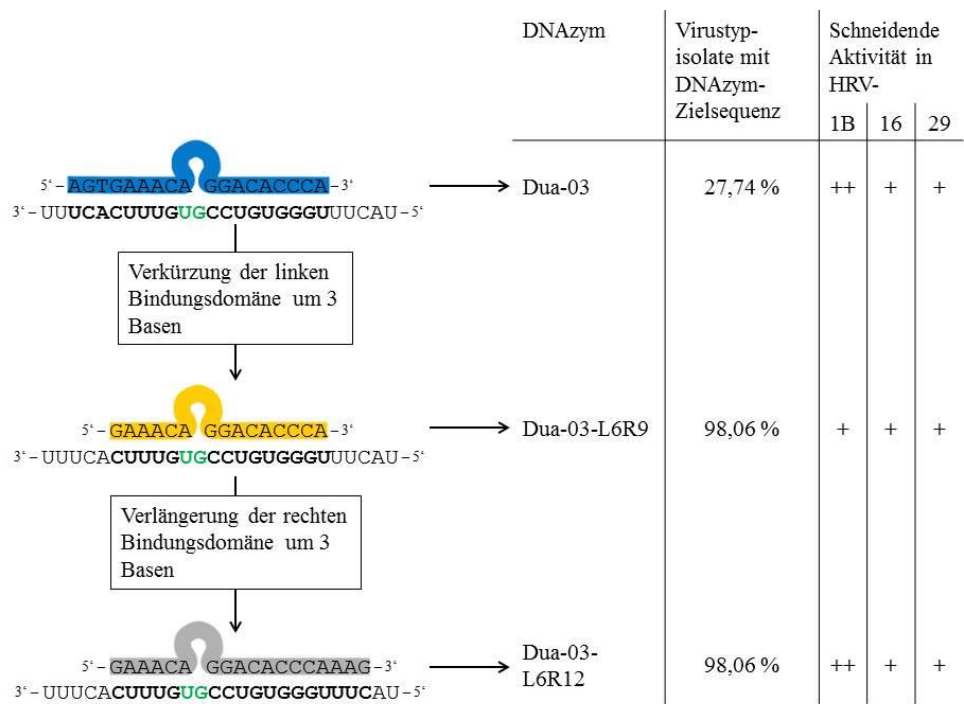
**Abb. 32 Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-02 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität:** Die DNAzyme Dua-02 (blau), Dua-02-L6R6 (gelb) und Dua-02-L10R12 (grau) mit den Zielsequenzen auf den Virus-RNA Fragmenten mit Bindungssequenzen (fett gedruckt) und Schnittstelle (grün), Schneidende Aktivität: schwach (+), mäßig (++), stark (+++), ausgezeichnet (++++)



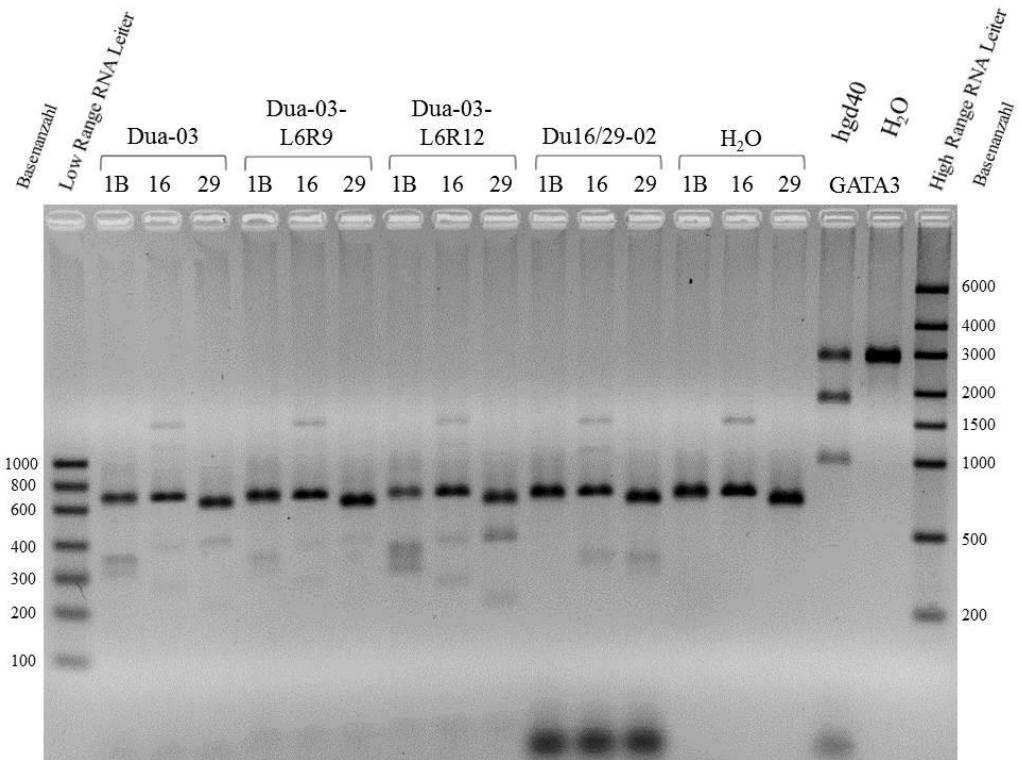
**Abb. 33** Testung von Längenvarianten des DNazyms Dua-02; 30 pmol des untersuchten DNazyms (Dua-02, Dua-02-L6R6, Dua-02-L10R12 und Dua-04) mit 150 ng Virus-RNA (5'-UTR der Testviren HRV-1B, -16 und -29) pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

### 3.3.2.3 Längenvariation von Dua-03

Aus der *in silico* Analyse war ersichtlich geworden, dass die Zielsequenz des DNazyms Dua-03 an Schnittstelle 5 nicht komplett innerhalb des hoch konservierten Abschnitts des viralen Genoms liegt und dadurch nur in 27,74% der Virustypisolate vorhanden ist. Die Schnittstelle des DNazyms liegt genau am Ende der Stamm-Schlaufen-Domäne, sodass die Zielsequenz der rechten Bindungsdomäne komplett innerhalb, die Zielsequenz der linken Bindungsdomäne komplett außerhalb dieser Sekundärstruktur liegt. Um eine breitere Abdeckung von Virustypisolaten zu ermöglichen, musste die linke Bindungsdomäne um drei Basen verkürzt werden. Dadurch wurde das neue DNazym, Dua-03-L6R9, mit Abdeckung von 98,06% der Virustypisolate, geschaffen. In der *in vitro* Testung von Dua-03-L6R9 zeigte sich allerdings, wie erwartet, nur schwache Aktivität gegen die drei Testviren. Durch eine weitere Veränderung, in Form einer Verlängerung der rechten Bindungsdomäne um 3 Basen konnte die Verbesserung in der Abdeckung von Virustypen beibehalten und gleichzeitig die *in vitro* Aktivität gegen alle Testviren gesteigert werden (siehe Abb. 34 und Abb. 35).



**Abb. 34** Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-03 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität: Die DNAzyme Dua-03 (blau), Dua-03-L6R9 (gelb) und Dua-03-L6R12 (grau) mit den Zielsequenzen auf den Virus-RNA Fragmenten mit Bindungssequenzen (fett gedruckt) und Schnittstelle (grün), Schneidende Aktivität: schwach (+), mäßig (++), stark (+++), ausgezeichnet (++++)



**Abb. 35** Testung von Längenvarianten des DNAzyms Dua-03; 30 pmol des untersuchten DNAzyms (Dua-03, Dua-03-L6R9, Dua-03-L6R12 und Du16/29-02) mit 150 ng Virus-RNA (5'-UTR der Testviren HRV-1B, -16 und -29) pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

#### 3.3.2.4 Effekte der isolierten Aufspaltung der Stamm-Schlaufen Subdomäne

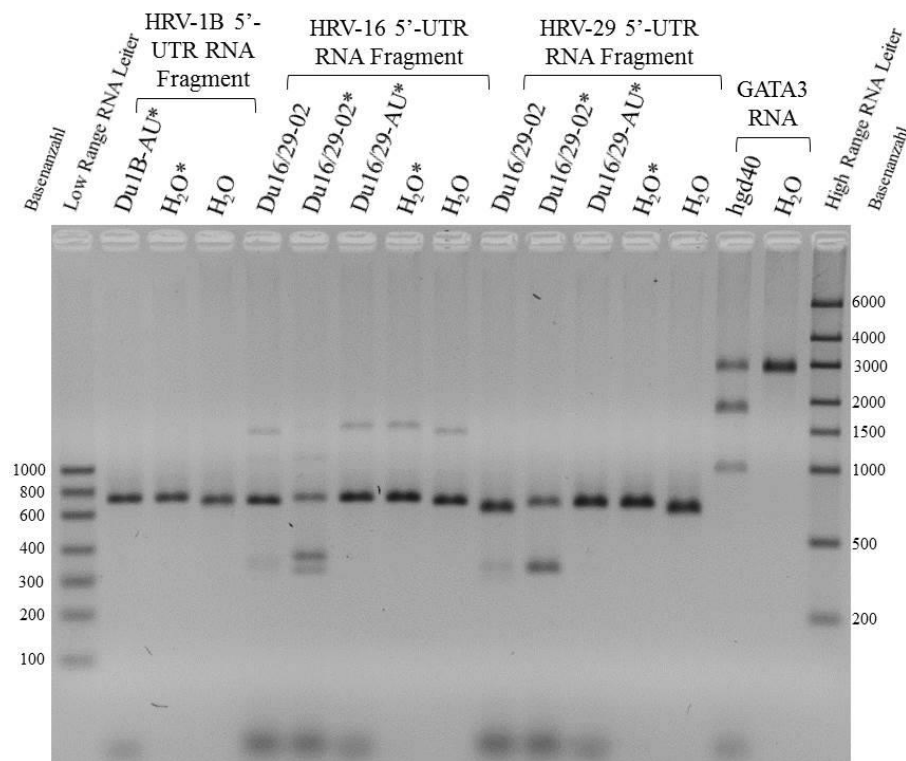
Durch die Längenvariation der Bindungsdomänen im Bereich der Schnittstellen 3, 4 und 5 in der 5'-UTR konnte eine deutliche Verbesserung in den Eigenschaften der DNAzyme erreicht werden. Die Hypothese, dass die Stamm-Schlaufen Domäne eine gute Bindung der ursprünglichen DNAzyme mit kurzen Bindungsarmen behindert, DNAzyme mit längeren Bindungsarmen aber in der Lage sind diese Sekundärstruktur aufzubrechen und dadurch stärkere Aktivität zu entwickeln, wird durch diese Ergebnisse unterstützt.

Um diese Beobachtungen zu überprüfen, wurde das Oligonukleotid Loopbreaker23 entworfen. Es besitzt die Sequenz der beiden Bindungsarme des DNAzyms Dua-02-L10R12, enthält allerdings keine mittlere katalytische Domäne. Dadurch ist es nicht in der Lage, selbst katalytisch aktiv zu sein und RNA zu schneiden, sondern kann sich lediglich durch seine zur Ziel-RNA komplementäre Basensequenz an diese anlagern. Es soll überprüft werden, welchen Effekt die Bindung der Basensequenz auf die Formation der Stamm-Schlaufen Subdomäne hat. Als Indikator für eine erfolgreiche Aufspaltung dieser Sekundärstruktur durch das Oligonukleotid Loopbreaker23, wurde die spaltende Aktivität des DNAzyms Du16/29-02 an Schnittstelle 2 (siehe Abb. 29) unter Zugabe von Loopbreaker23 verglichen mit der Aktivität des DNAzyms ohne Zugabe des Oligonukleotids.

Durch die Lage der Schnittstelle von Du16/29-02 liegt die Zielsequenz auf der viralen RNA bei Formation der Stamm-Schlaufen Subdomäne komplett innerhalb dieser Struktur und ist deswegen nicht frei zugänglich. Um katalytisch aktiv zu werden, muss das DNAzym die bestehenden intramolekularen Basenpaarungen lösen und selbst komplementäre Bindungen eingehen. Entsprechend wird die Bindung des DNAzyms durch eine Aufspaltung der Stamm-Schlaufen Subdomäne vereinfacht und sollte zu einer verstärkten katalytischen Aktivität des DNAzyms führen.

Es zeigte sich eine deutlich verstärkte Aktivität von Du16/29-02 unter Zugabe von Loopbreaker23 in beiden Testviren mit einer Zielsequenz für das DNAzym Du16/29-02. Ohne Zugabe des Oligonukleotids konnte in den beiden Testviren HRV-16 und -29 jeweils schwache Aktivität beobachtet werden, unter Zugabe von Loopbreaker23 zeigte sich mäßige bis starke Aktivität (siehe Abb. 36).

Daraus kann gefolgert werden, dass das Oligonukleotid Loopbreaker23 in der Lage ist, die Sekundärstruktur der viralen RNA in Form der Stamm-Schlaufen Subdomäne aufzubrechen. Entsprechend haben auch die Längenvarianten der zuvor getesteten DNAzyme diese Eigenschaft, was ihre verbesserte katalytische Aktivität zumindest teilweise erklärt.



**Abb. 36** Testung der Effekte von Loopbreaker23 auf die DNazym-Aktivität (Testung der DNzyme Du16/29-02, Du1B-AU und Du16/29-AU ohne und mit Zugabe von Loopbreaker23 (\*)); 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe sowie 20 pmol Loopbreaker23 in allen mit \* markierten Proben auf 2,5% TAE-Agarosegel

Die neuen DNzyme Du1B-AU und Du16/29-AU an der möglichen Schnittstelle 1.5 (siehe Abschnitt 3.2.1) zeigten auch unter Zugabe von Loopbreaker23 keine katalytische Aktivität *in vitro*, sodass beschlossen wurde, sie nicht weiter zu untersuchen.

### 3.4 Weitere Optimierung der gefundenen DNzyme

Es konnte gezeigt werden, dass durch Längenvariation der DNazym-Bindungsdomänen sowohl die Abdeckung von Virustypen, als auch die Aktivität der DNzyme gegen die Testvirus-Fragmente *in vitro* gesteigert werden können.

#### 3.4.1 Qualitative Analyse weiterer Längenvarianten

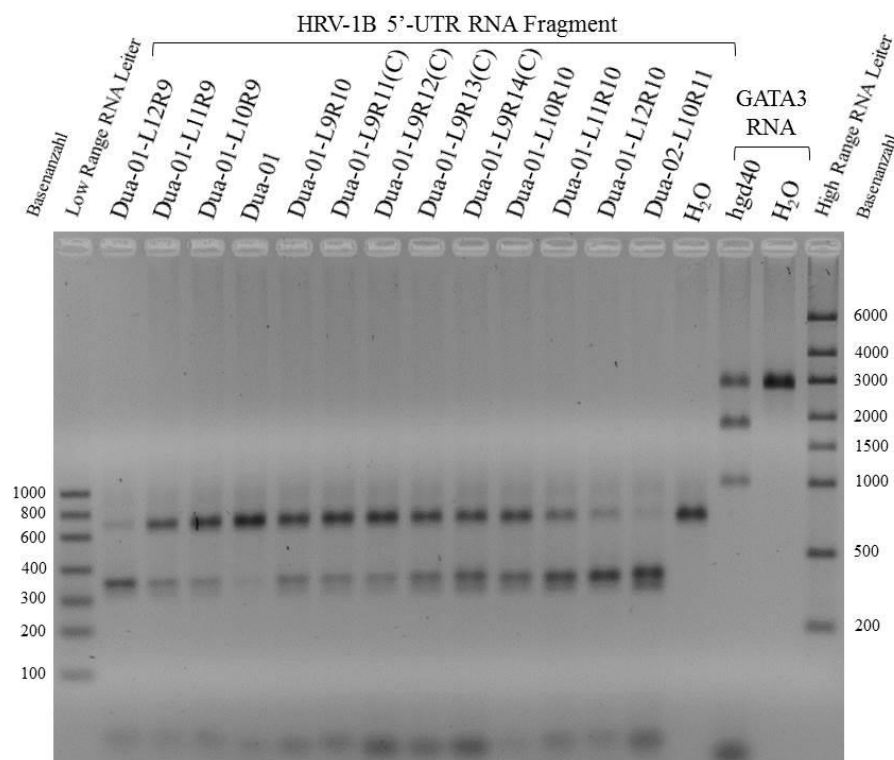
Im Folgenden wurden die Effekte einer schrittweisen Verlängerung der Bindungsdomänen untersucht. Dazu wurde eine qualitative Analyse der Spaltungsaktivität der verschiedenen möglichen Längenvarianten an den drei gefundenen Schnittstellen 3, 4 und 5 mittels Spaltungsprüfungen aller drei Testviren durchgeführt.

##### 3.4.1.1 Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 3

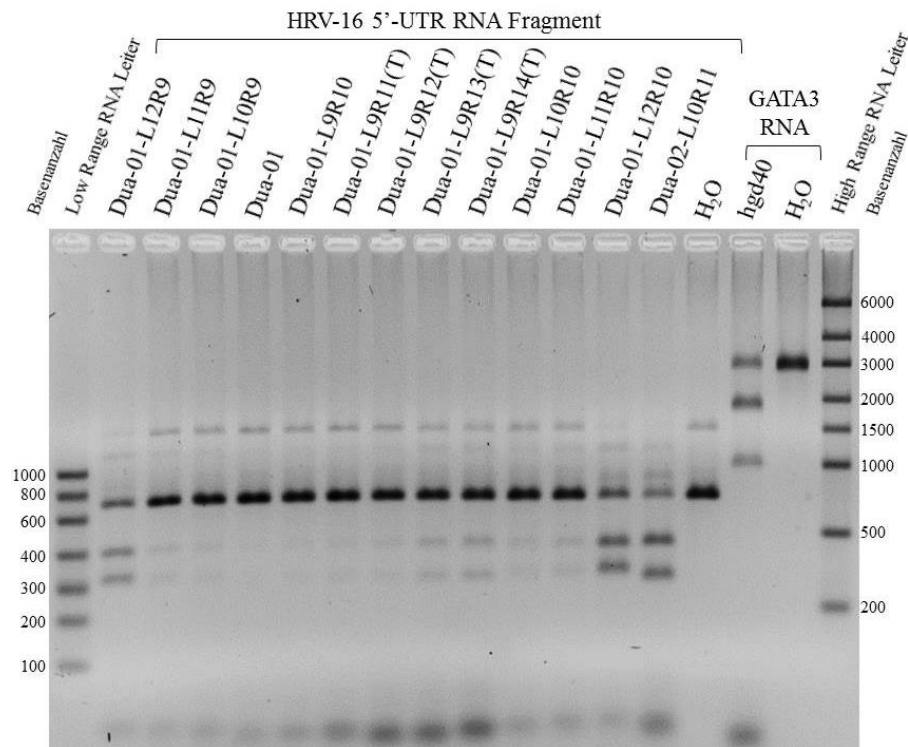
Die linke Bindungsdomäne des ursprünglichen DNazym Du01 wurde schrittweise um maximal 3 zusätzliche Basen verlängert, sowohl isoliert als auch kombiniert mit

einer Verlängerung der rechten Bindungsdomäne um eine Base. Dabei zeigte sich in beiden Fällen eine schrittweise Verstärkung der Spaltungsaktivität. Auf eine weitere Verlängerung der linken Bindungsdomäne wurde verzichtet, da die folgenden Basen nicht mehr innerhalb der hoch-konservierten Zielsequenz liegen und dies somit eine erhebliche Beeinträchtigung der Abdeckung anderer Virustypen zur Folge hätte. Die rechte Bindungsdomäne wurde schrittweise um maximal 5 Basen verlängert. Dafür war es nötig, zwei Versionen der Längenvarianten herzustellen, da sich die Zielsequenzen der Testviren in dieser Richtung an einer Stelle um eine Base unterscheiden. Entsprechend wurde Testvirus HRV-1B mit einer Guanin-, Testviren HRV-16 und -29 mit einer Adenin-enthaltender DNAzym Version getestet. Eine Verlängerung dieser Bindungsdomäne um eine Base zeigte einen deutlichen Anstieg der Spaltungsaktivität. Eine größere Verlängerung ergab zwar weiterhin wirksame DNAzyme, eine weitere Verstärkung der Spaltungsaktivität konnte jedoch erst mit einer deutlichen Verlängerung um 4 bzw. 5 Basen erreicht werden. Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass die DNAzym Varianten Dua-01-L12R9 und Dua-01-L12R10 in dieser Prüfung beide die besten Ergebnisse mit starker Aktivität in HRV-16 und -29 und ausgezeichneter Aktivität in HRV-1B zeigten.

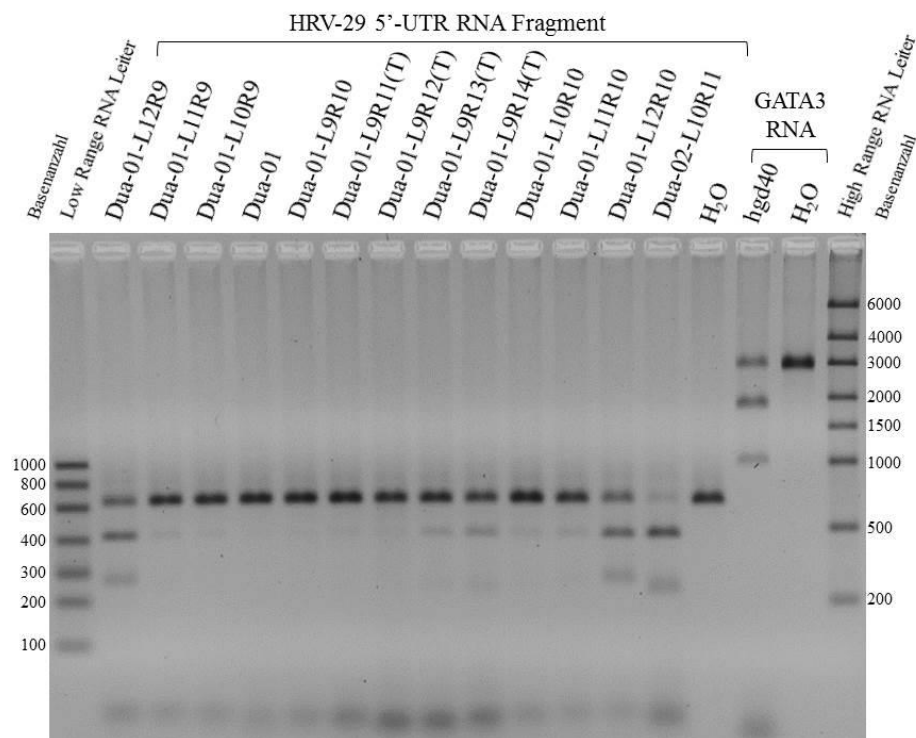
Im Folgenden sind die Bilder der Spaltungsprüfungen von Längenvarianten des DNAzyms Dua-01 mit allen drei Testviren aufgeführt (siehe Abb. 37, Abb. 38 und Abb. 39).



**Abb. 37** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-1B 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 38** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-16 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 39** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-29 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

#### 3.4.1.2 Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 4

Die linke Bindungsdomäne des ursprünglichen DNAzyms Dua-02 wurde nur um 1 Base verlängert, da eine weitere Verlängerung nur mit einem erheblichen Verlust der



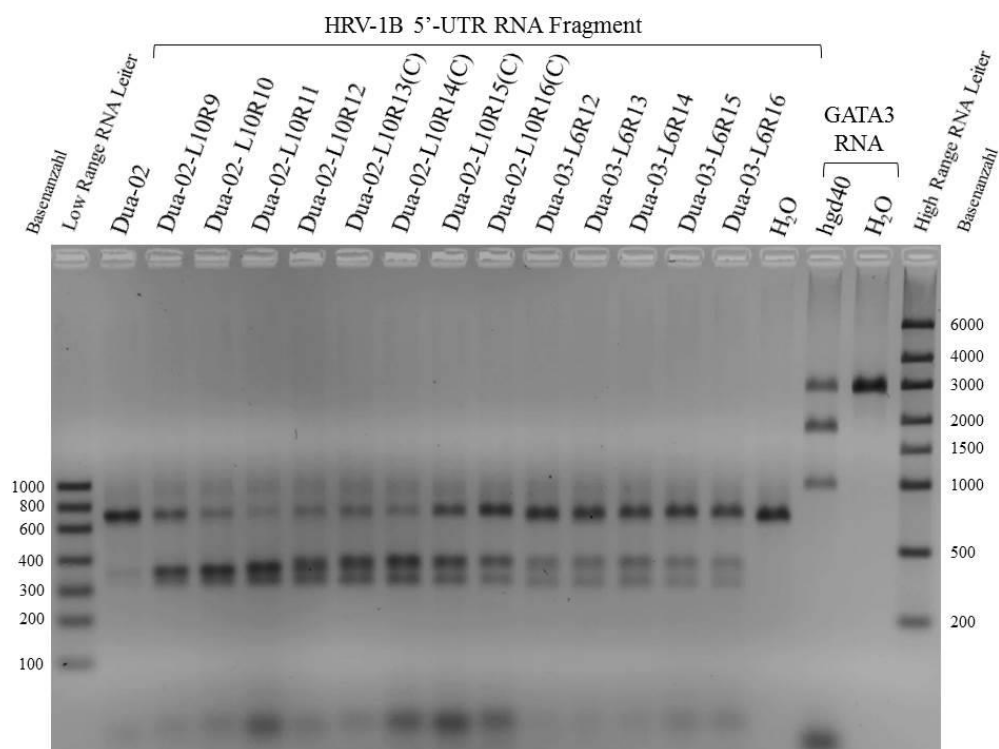
Abdeckung von weiteren Virustypen möglich ist. Allerdings zeigte schon diese Veränderung eine deutliche Steigerung der Spaltungsaktivität. Die rechte Bindungsdomäne wurde schrittweise um maximal 7 Basen verlängert. Hier war es nötig, zwei Versionen der Längenvarianten herzustellen, da sich die Zielsequenzen der Testviren in 5'-Richtung an einer Stelle um eine Base unterscheiden. Entsprechend wurde der Testvirus HRV-1B mit einer Guanin-, Testviren HRV-16 und -29 mit einer Adenin-enhaltender DNAzym Version getestet. Die Verlängerung dieser Bindungsdomäne zeigte mit den ersten zwei zusätzlichen Basen jeweils eine deutliche Zunahme der Spaltungsaktivität. Mit der weiteren Verlängerung konnte jedoch keine weitere Verbesserung erzielt werden. Vielmehr nahm die Spaltungsaktivität mit zunehmender Länge der Bindungsdomäne wieder ab. Als beste Variante konnte das DNAzym Dua-02-L10R11 mit starker Aktivität in HRV-16 und ausgezeichneter Aktivität in HRV-1B und -29 identifiziert werden.

Für die Bilder der Spaltungsprüfungen siehe Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42.

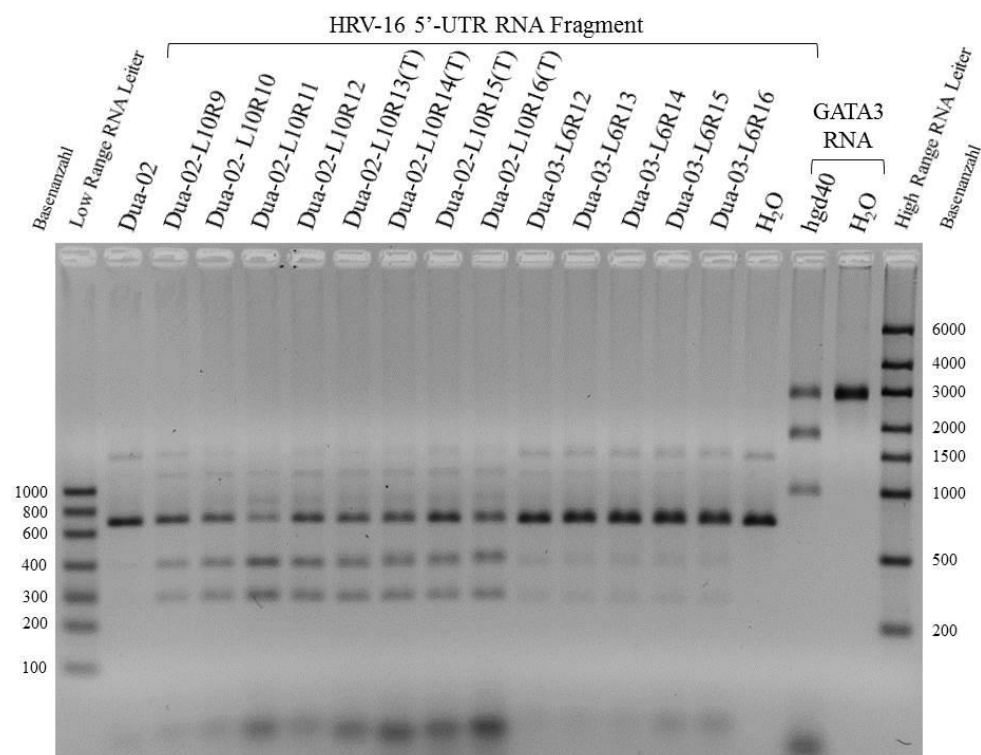
#### **3.4.1.3 Testung weiterer Längenvarianten an Schnittstelle 5**

Die linke Bindungsdomäne des ursprünglichen DNAzyms Dua-03 wurde ausschließlich in einer um drei Basen verkürzten Version getestet, da nur durch diese Variation eine ausreichende Abdeckung von Virustypen gewährleistet werden kann. Folglich wurde lediglich die rechte Bindungsdomäne verändert, wobei hier orientierend getestet wurde, wie sich eine weitere Verlängerung von drei bis maximal 7 zusätzlichen Basen auf die Spaltungsaktivität auswirkt. In dieser unvollständigen Überprüfung konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten nachgewiesen werden, die alle mäßige Aktivität in HRV-1B und schwache Aktivität in HRV-16 und -29 zeigten.

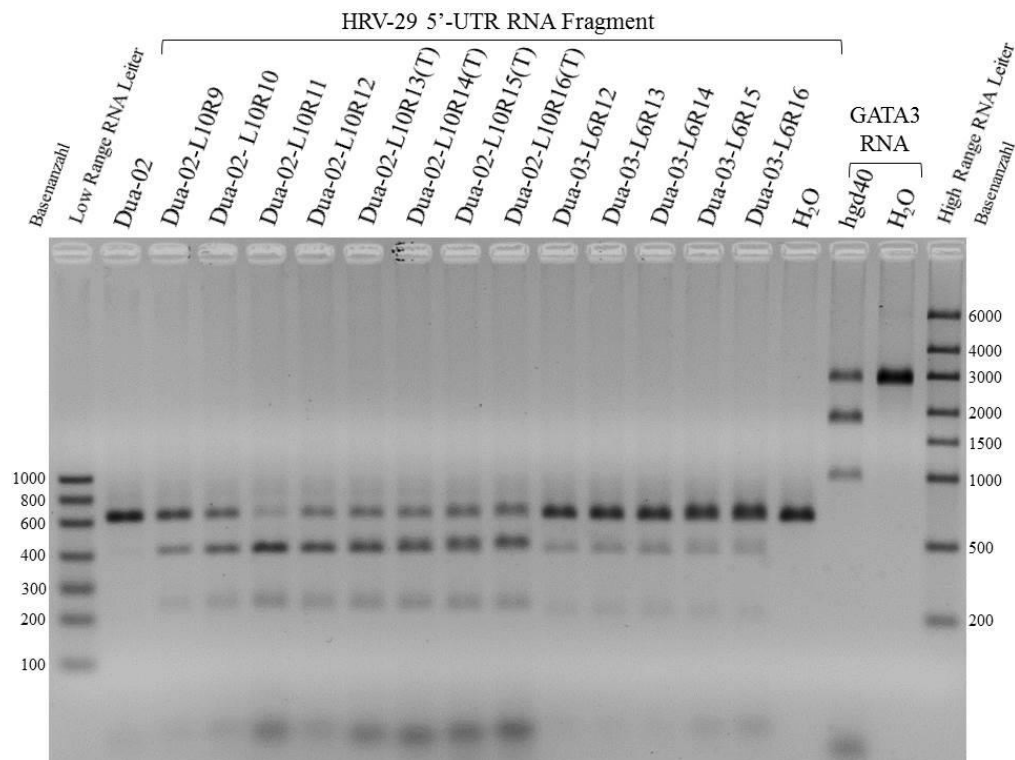
Im Folgenden sind die Bilder der Spaltungsprüfungen von Längenvarianten der DNAzyme Dua-02 und Dua-03 mit allen drei Testviren aufgeführt (siehe Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42).



**Abb. 40** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-1B 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 41** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-16 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel



**Abb. 42** Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-29 5'-UTR; 150 ng Virus-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel

#### 3.4.1.4 Schlussfolgerungen

Bei der Testung der Längenvarianten konnte erneut gezeigt werden, dass eine Variation in der Länge der Bindungsdomänen erheblichen Einfluss auf die schneidende Aktivität der DNAzyme hat. Insbesondere zeigte sich auch, dass dieser Einfluss nicht vom Testvirus abhängig ist, sondern dass bestimmte Längenvarianten in allen Testviren stärkere Aktivität zeigen, während andere Varianten durchgehend zu schwächerer Aktivität führen. Ebenso konnte festgestellt werden, dass sich die Spaltungsaktivität nicht proportional zur Verlängerung der Bindungsdomänen verhält. Vielmehr scheint für jede Bindungsdomäne der DNAzyme speziell eine ideale Längenvariante zu existieren.

#### 3.4.2 Quantitative Analyse möglicher Längenvarianten

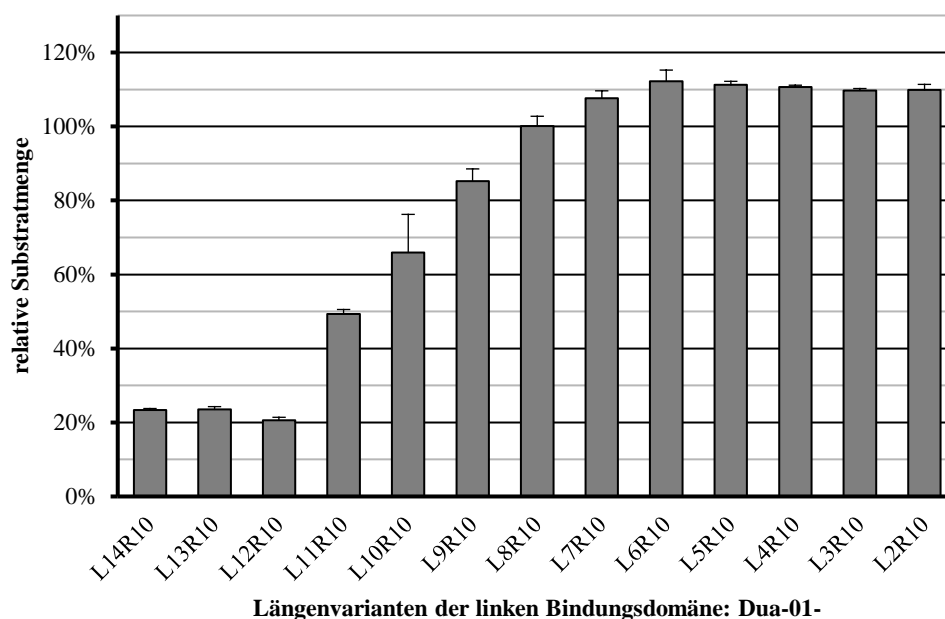
Abschließend wurde eine quantitative Analyse der Spaltungsaktivität möglicher Längenvarianten durchgeführt. Da die vorangegangenen Experimente bereits gezeigt hatten, dass die Längenvariation den gleichen Einfluss auf die Spaltungsaktivität in allen drei Testviren hat, wurde beschlossen, die quantitative Analyse auf die Testung mit einem Testvirus zu beschränken. Ausgewählt wurde HRV-1B, da dieser Testvirus in den Voruntersuchungen die deutlichsten Ergebnisse geliefert hatte und neben optimalen Bindungsdomänen - maximal mögliche Spaltungsaktivität bei möglichst kurzen Bindungsdomänen - auch auf minimal noch vorhandene Aktivität bei möglichst

kurzen Bindungsdomänen getestet werden sollte. Dafür wurde aus den vorangegangenen Experimenten die beste Länge einer Bindungsdomäne abgeschätzt und in dieser Länge fixiert, während die andere Bindungsdomäne variiert wurde, um sie zu testen. Nach der Spaltungsprüfung wurde die Bandenintensität des verbliebenen Substrats mittels LabImage 1D densitometrisch gemessen und durch Vergleich mit der Negativ-Kontrolle der prozentuale Abbau berechnet. Die Bilder der Spaltungsprüfungen, welche zur Erhebung der Daten in den folgenden Graphen dienten, finden sich im Anhang unter Abschnitt 12.1.2. Eine kritische Betrachtung der Aussagekraft der erhobenen Werte dieser und folgender quantitativer Analysen kann ebenfalls dem Anhang unter Abschnitt 12.1.3 entnommen werden.

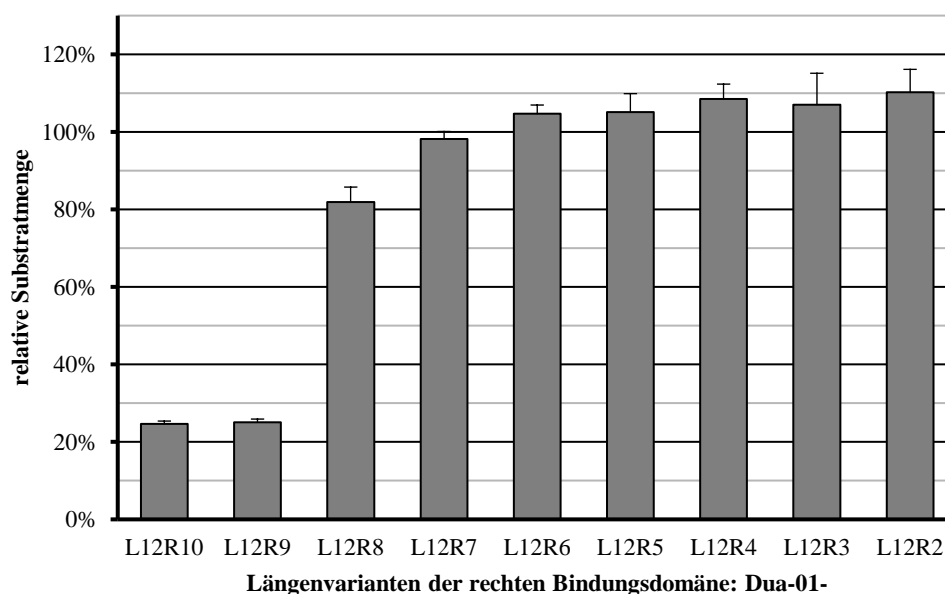
#### **3.4.2.1 Quantitative Testung an Schnittstelle 3**

Für die Testung der linken Bindungsdomäne des an Schnittstelle 3 angreifenden DNAzyms Dua-01 wurde die rechte Bindungsdomäne mit einer Länge von insgesamt 10 Basen fixiert. Die linke Bindungsdomäne wurde schrittweise von minimal 2 auf maximal 14 Basen verlängert. Sicher nachweisbare Aktivität mit unter 90 Prozent verbliebener Virus-RNA zeigte als kürzeste Variante Dua-01-L9R10 mit 9 Basen. Mit dieser Bindungsdomänenlänge können 98,39 Prozent aller Virustypisolate abgedeckt werden. Die stärkste Reduktion der viralen RNA auf 20 Prozent des Ausgangswerts konnte mit Dua-01-L12R10 - einer linken Bindungsdomäne von insgesamt 12 Basen Länge und damit einer Zielsequenz in 98,06 Prozent aller Virustypisolate - erreicht werden (siehe Abb. 43).

Für die Testung der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 wurde die linke Bindungsdomäne mit einer Länge von insgesamt 12 Basen fixiert und die rechte Bindungsdomäne schrittweise von minimal 2 bis maximal 10 Basen verlängert, wobei mit allen Varianten eine Abdeckung aller Virustypisolate von mindestens 98,06 Prozent gegeben war. Dabei zeigte Dua-01-L12R8 mit 8 Basen als kürzeste Variante sicher nachweisbare Aktivität mit einer Reduktion der Substrat-RNA auf unter 90 Prozent. Die stärkste Aktivität mit Reduktion der viralen RNA auf 25 Prozent des Ausgangswerts erreichten sowohl Dua-01-L12R9 als auch Dua-01-L12R10, mit einer rechten Bindungsdomäne von insgesamt 9 bzw. 10 Basen (siehe Abb. 44).



**Abb. 43** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von DNAzym Dua-01 an Schnittstelle 3



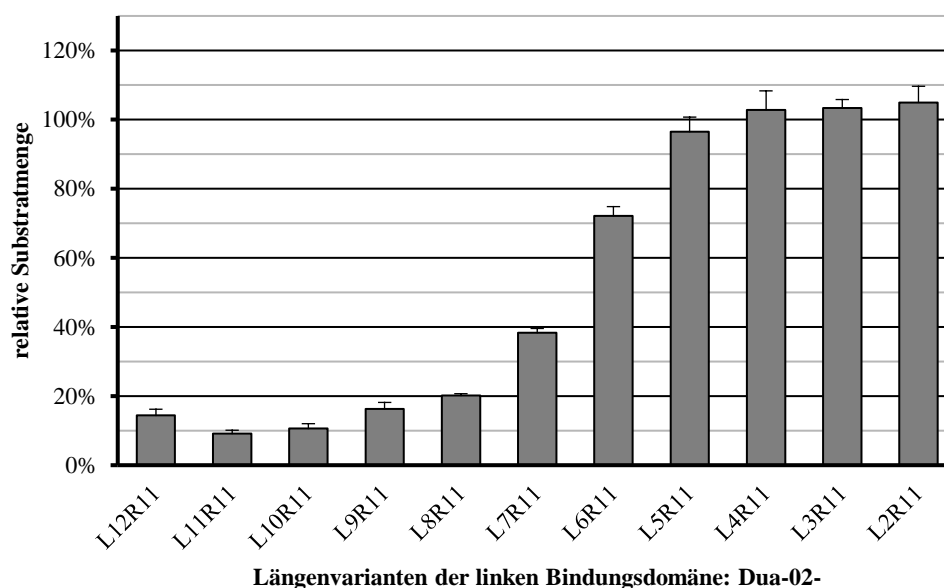
**Abb. 44** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von DNAzym Dua-01 an Schnittstelle 3

### 3.4.2.2 Quantitative Testung an Schnittstelle 4

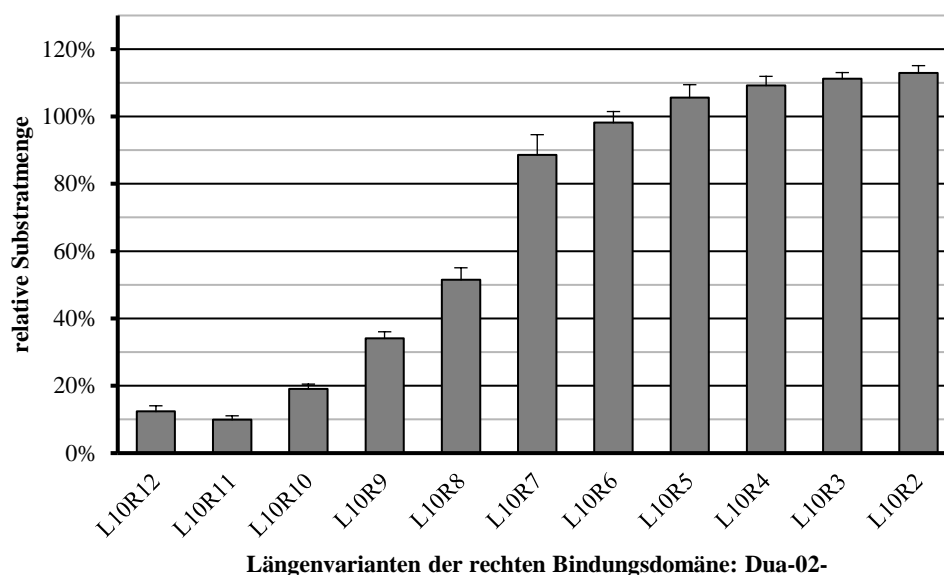
Für die Testung der linken Bindungsdomäne des an Schnittstelle 4 angreifenden DNAzyms Dua-02 wurde die rechte Bindungsdomäne mit einer Länge von insgesamt 11 Basen fixiert und die linke Bindungsdomäne schrittweise von minimal 2 auf maximal 12 Basen verlängert. Als kürzeste Variante zeigte Dua-02-L6R11 mit 6 Basen sicher nachweisbare Aktivität mit Abbau der Virus-RNA auf unter 90 Prozent. Mit dieser

Bindungsdomänenlänge werden 98,71 Prozent aller Virustypisolate abgedeckt. Die stärkste Reduktion des Substrats auf 10 Prozent des Ausgangswerts und konnte mit Dua-02-L10R11 und Dua-02-L11R11 - einer linken Bindungsdomäne von insgesamt 10 bzw. 11 Basen Länge - erreicht werden (siehe Abb. 45). Dabei gilt jedoch zusätzlich zu beachten, dass die Zielsequenz der Bindungsdomäne mit 11 Basen schon teilweise außerhalb des hoch konservierten Genabschnitts liegt und deswegen nur in 29,45 Prozent aller Virustypisolate enthalten ist. Die Zielsequenz der Bindungsdomäne mit 10 Basen liegt hingegen bei 98,06 Prozent aller Virustypisolate vor.

Zur Testung der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 wurde die linke Bindungsdomäne bei insgesamt 10 Basen Länge fixiert und die rechte Bindungsdomäne wurde schrittweise von minimal 2 bis maximal 12 Basen verlängert, wobei bei allen Varianten eine Abdeckung der Virustypisolate von mindestens 98,06 Prozent gegeben war. Die kürzeste Variante mit sicher nachweisbarer Aktivität und damit Abbau des Substrats auf unter 90 Prozent war Dua-02-L10R7 mit 7 Basen. Die stärkste Aktivität mit Reduktion der viralen RNA auf 10 Prozent des Ausgangswerts erreichte Dua-02-L10R11 mit einer rechten Bindungsdomäne von insgesamt 11 Basen (siehe Abb. 46).



**Abb. 45** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von DNAsym Dua-02 an Schnittstelle 4

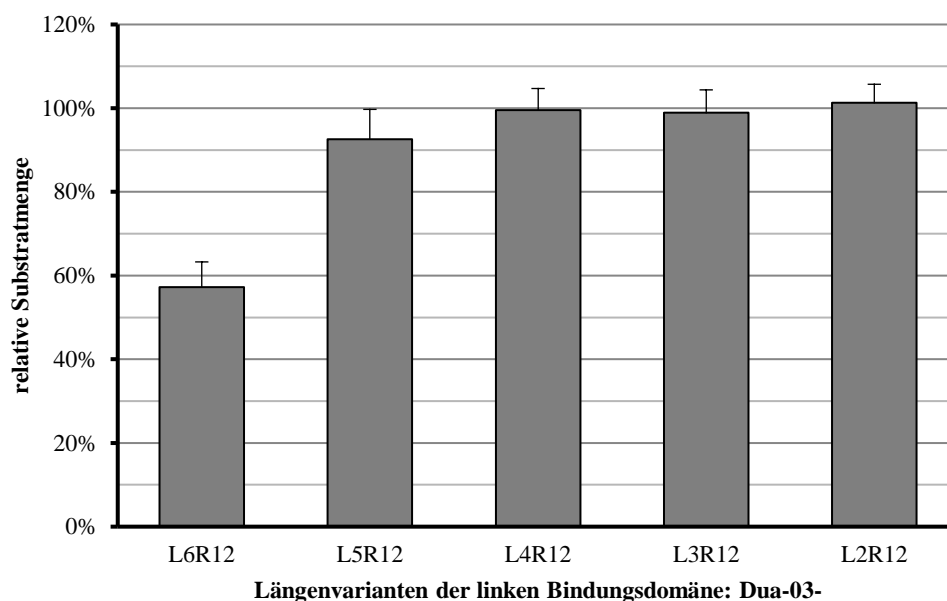


**Abb. 46** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne des DNAzyms Dua-02 an Schnittstelle 4

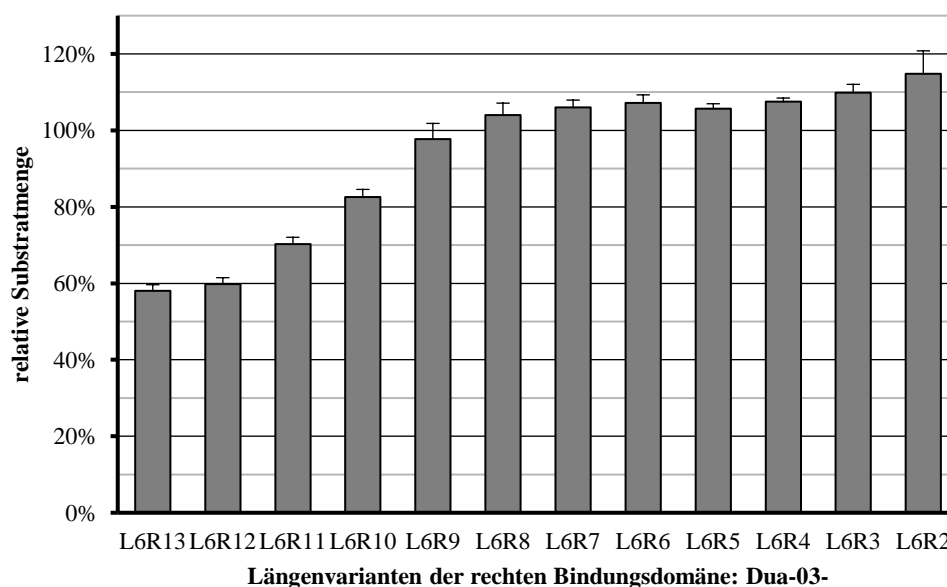
### 3.4.2.3 Quantitative Testung an Schnittstelle 5

Für die Testung der linken Bindungsdomäne des an Schnittstelle 5 angreifenden DNAzyms Dua-03 wurde die rechte Bindungsdomäne mit einer Länge von insgesamt 12 Basen fixiert und die linke Bindungsdomäne schrittweise von minimal 2 auf maximal 6 Basen verlängert. Als kürzeste Variante zeigte Dua-03-L5R12 mit 5 Basen tendenziell nachweisbare Aktivität, erreichte dabei aber keine Reduktion der Substrat-RNA unter 90 Prozent. Sichere und stärkste Reduktion der viralen RNA auf unter 60 Prozent des Ausgangswerts konnte mit Dua-03-L6R12 - einer linken Bindungsdomäne von insgesamt 6 Basen Länge - erreicht werden (siehe Abb. 47). Beide funktionellen Varianten besitzen eine Abdeckung von 98,06 Prozent aller Virustypisolate.

Zur Testung der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 wurde die linke Bindungsdomäne mit einer Länge von insgesamt 6 Basen fixiert und die rechte Bindungsdomäne schrittweise von minimal 2 bis maximal 13 Basen verlängert, wobei bei allen Varianten eine Abdeckung der Virustypisolate von mindestens 98,06 Prozent gegeben war. Die kürzeste Variante mit sicher nachweisbarer Reduktion der viralen RNA auf unter 90 Prozent war Dua-03-L6R10 mit 10 Basen. Die stärkste Aktivität mit Reduktion der viralen RNA auf leicht unter 60 Prozent des Ausgangswerts erreichten Dua-03-L6R12 und Dua-03-L6R13 mit einer rechten Bindungsdomäne von insgesamt 12 bzw. 13 Basen (siehe Abb. 48).



**Abb. 47** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne des DNAzyms Dua-03 an Schnittstelle 5



**Abb. 48** Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne des DNAzyms Dua-03 an Schnittstelle 5

#### 3.4.2.4 Selektionsergebnis

Es konnten drei Schnittstellen in der 5'-UTR in unmittelbarer Nähe zueinander identifiziert werden, für die es gelang hochwirksame DNAzyme zu entwickeln, die in der Lage sind mit 98,06 Prozent fast die Gesamtheit der bekannten Virustypisolate abzudecken.



Als am besten wirksamstes DNAzym wurde Dua-02-L10R11 an Schnittstelle 4 mit optimalen Bindungsdomänen von 10 Basen links und 11 Basen rechts selektiert. Es zeigte in der quantitativen Analyse eine Spaltungsaktivität von 90 Prozent gegenüber dem Testvirus HRV-1B.

Als zweite sehr gute Variante wurde Dua-01-L12R9 an Schnittstelle 3 mit optimalen Bindungsdomänen von 12 Basen links und 9 Basen rechts ausgewählt. Es zeigte in der quantitativen Analyse mit dem Testvirus HRV-1B eine Spaltungsaktivität von 80-85 Prozent.

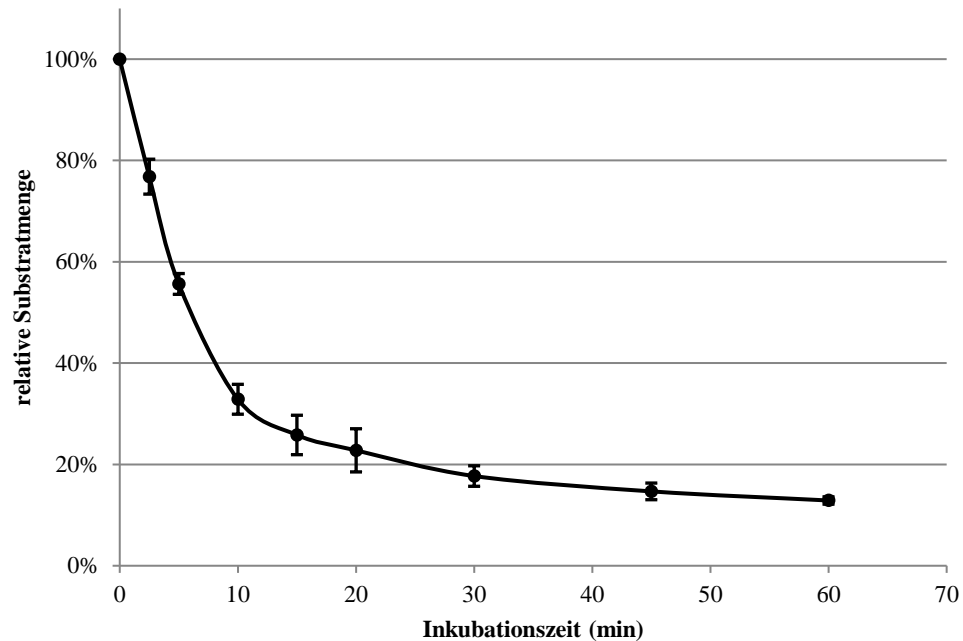
Als weiteres mögliches DNAzym wurde Dua-03-L6R12 an Schnittstelle 5 mit optimalen Bindungsdomänen von 6 Basen links und 12 Basen rechts identifiziert. Allerdings zeigte dieses DNAzym mit knapp über 40 Prozent eine deutlich schwächere Aktivität gegenüber dem Testvirus HRV-1B, als die Varianten an den Schnittstellen 3 und 4.

### **3.5 Abschließende Untersuchungen**

Nachdem es gelungen war mit dem DNAzym Dua-02-L10R11 eine klar beste Variante zu selektieren wurde es abschließend nochmals im Hinblick auf seinen Einsatz *in ex vivo* und *in vivo* Bedingungen untersucht.

#### **3.5.1 Abhängigkeit von der Inkubationszeit**

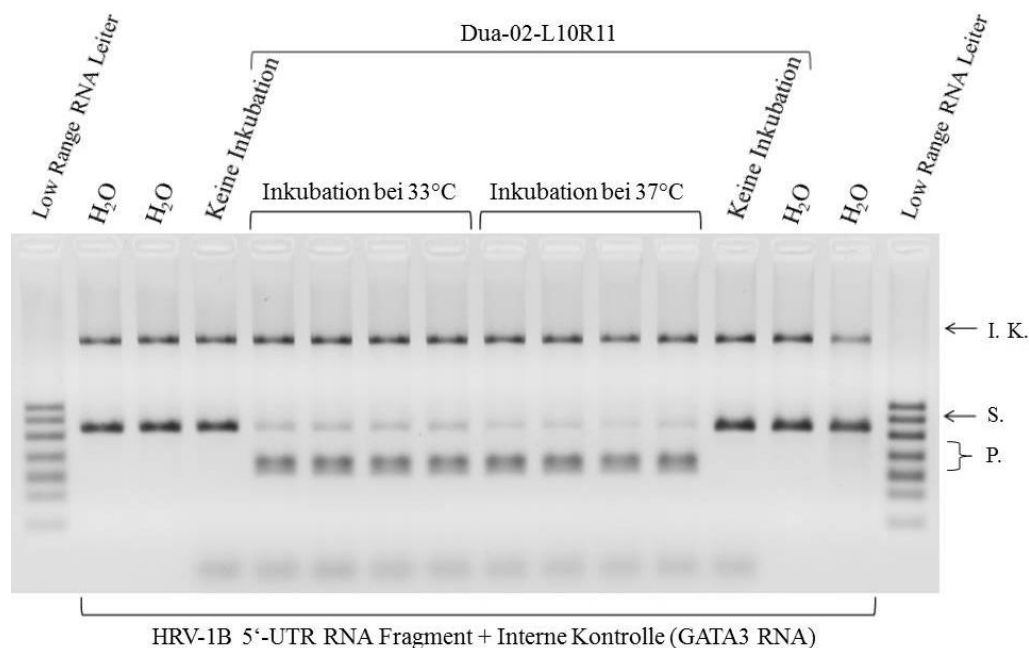
Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Länge der Inkubationszeit auf das Ergebnis der Spaltungsprüfungen hat. Dabei zeigte Dua-02-L10R11 schon nach dem ersten Messpunkt bei 150 Sekunden eine starke Reduktion der Substrat-RNA auf unter 80 Prozent. Nach 10 Minuten war mit unter 35 Prozent verbliebenem Substrat bereits deutlich mehr als die Hälfte des Virus-RNA Fragments umgesetzt. Nach einer halben Stunde erreichte das DNAzym eine Reduktion des Substrats auf weniger als 20 Prozent des Ausgangswertes (siehe Abb. 49). Die dem Diagramm zu Grunde liegenden Bilder der Spaltungsprüfungen finden sich im Anhang unter 12.1.2.4.



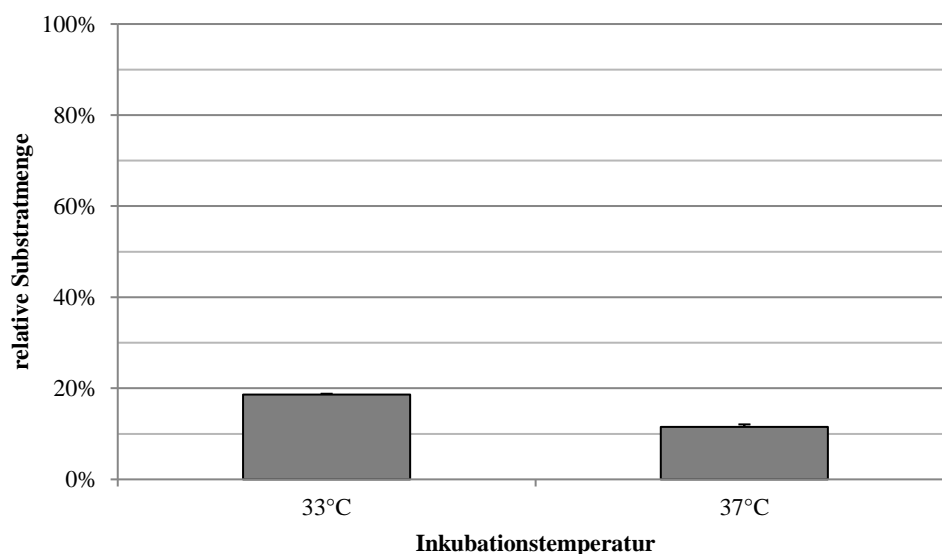
**Abb. 49** Ausmaß der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 gegenüber dem HRV-1B 5'-UTR Fragment in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

### 3.5.2 Temperaturabhängigkeit

Es wurde außerdem untersucht, welchen Einfluss eine niedrigere Inkubationstemperatur von 33°C gegenüber der stets vorher getesteten 37°C auf die Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 hat. Dabei zeigte sich die Spaltungsaktivität leicht beeinträchtigt, jedoch mit unter 20 Prozent verbliebener Substratmenge in der quantitativen Auswertung immer noch sehr stark. Für das Ergebnis der durchgeführten Spaltungsprüfung siehe Abb. 50. Für die quantitative Auswertung wurden die Mittelwerte der Substratbandenintensität der jeweils vier getesteten Proben pro Temperaturstufe mit dem Mittelwert der Bandenintensität der beiden Proben ohne Inkubation in Relation gesetzt, um die relativ verbliebene Substratmenge zu berechnen (siehe Abb. 51).



**Abb. 50** Testung der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 7,5 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

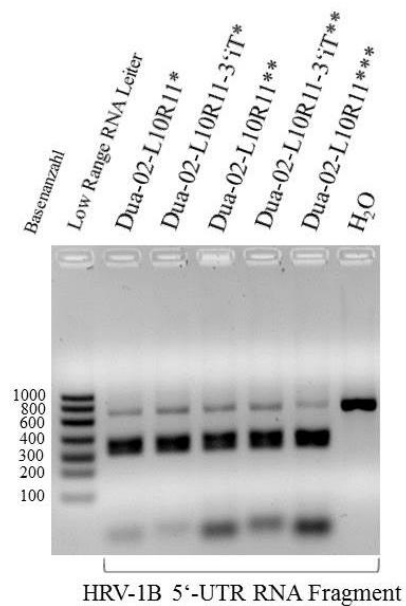


**Abb. 51** Ausmaß der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 gegenüber des HRV-1B 5'-UTR Fragments in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

### 3.5.3 DNAzym-Modifikation

Um die Haltbarkeit des DNAzyms Dua-02-L10R11 im Zellmilieu zu erhöhen und es dadurch zukünftig *ex vivo* in Zellkulturen oder *in vivo* in Tierversuchen oder klinischen Studien verwenden zu können, wurde es durch das Anheften eines invertierten Thymidins an das 3'-Ende modifiziert. In vergleichenden Testungen der ursprünglichen

und modifizierten Version zeigten sich keine bedeutsamen Unterschiede in der Spaltungsaktivität (siehe Abb. 52).



**Abb. 52** Testung von Dua-02-L10R11 mit Modifikation; 150 ng Virus-RNA variable Mengen DNAzym pro Probe (\*7,5 pmol, \*\*20 pmol, \*\*\*40 pmol) auf 2,5% TAE-Agarosegel

## 4 DISKUSSION

Bei der Entwicklung eines Mittels gegen Rhinoviren muss berücksichtigt werden, dass alle Rhinovirustypen humanpathogen sind und deshalb Erkrankungen beim Menschen hervorrufen können. Eine große Anzahl unterschiedlicher Virustypen zirkuliert gleichzeitig innerhalb einer Population und verschiedene Genotypen kommen sogar parallel in einer Familie vor (Savolainen et al. 2002; Peltola et al. 2008). Zusätzlich sind jedes Jahr andere Virustypen nachzuweisen, sodass eine enorme Bandbreite an unterschiedlichen Typen für Erkrankungen verantwortlich sein kann (Olenec et al. 2010). Insbesondere die höher-virulenten Spezies A und C müssen beachtet werden (Lee et al. 2012). Ein Mittel gegen Rhinoviren sollte deswegen in der Lage sein möglichst alle bekannten Rhinovirustypen abzudecken, um erfolgsversprechend zu sein.

Weiterhin muss ein Therapeutikum gegen humane Rhinoviren sehr sicher und gut tolerierbar sein, da viele Patienten nur an einer leichten selbstlimitierten Erkrankung leiden und somit schon gering ausgeprägte unerwünschte Arzneimittelwirkungen nicht akzeptiert werden können (Patick 2006).

Zusätzlich besteht das Problem, dass eine Erkrankung mit Rhinoviren sehr schnell verläuft. Nach der Infektion können die ersten Symptome schon nach 10-12 Stunden auftreten, das volle Krankheitsbild tritt nach 1-2 Tagen auf und verschwindet, bei sonst gesunden Patienten, meist rasch innerhalb einer Woche (Harris und Gwaltney 1996; Lessler et al. 2009). Auch bei Asthmatikern, wo Rhinoviren eine deutlich länger anhaltende Symptomatik hervorrufen können, ist es wichtig, die Infektion initial aufzuhalten, um somit idealerweise eine Ausbreitung in die tiefen Atemwege zu verhindern (Gern et al. 1997). Problematisch ist dabei, dass Infektionen vor allem bei Erwachsenen asymptomatisch verlaufen können (Peltola et al. 2008). Bei einer vermuteten Infektion mit Rhinoviren muss deswegen sofort gehandelt und eine Therapie eingeleitet werden, um Aussicht auf Erfolg zu haben (Patick 2006). Somit bleibt eventuell kaum Zeit bei Verdacht eine spezifische Diagnose zu erheben, sondern es muss schnellstmöglich mit einer Therapie begonnen werden. Im Extremfall impliziert dies eine empirische Behandlung bei Verdacht auf eine Infektion und ggf. eine prophylaktische Behandlung von Risikopatienten bei direktem Kontakt zu erkrankten Individuen.

Folglich wäre es ein sinnvoller Ansatz, einer Infektion und möglichen Exazerbation von chronischen Lungenkrankheiten schon präventiv durch einen Impfstoff vorzubeugen. Entsprechende Bemühungen einen Impfstoff gegen alle Rhinovirustypen zu entwickeln, scheinen allerdings aufgrund verschiedener Problematiken derzeit nur sehr fraglich

zielführend (Papi und Contoli 2011). Das Hauptproblem bildet die große antigene Diversität der über 100 verschiedenen Virustypen, welche zusätzlich durch Rekombination bei parallelen Infektionen mit unterschiedlichen Typen und eine hohe Mutationsrate des Genoms ständig im Wandel sind (Palmenberg et al. 2010; Waman et al. 2014). Zwar gibt es mittlerweile Ansätze, welche Anteile des viralen Kapsidproteins als Zielantigene nutzen und teilweise eine Kreuzaktivität zwischen verschiedenen nicht verwandten Virustypen zeigen konnten (Edlmayr et al. 2011; Katpally et al. 2009), jedoch sind auch diese Projekte weit davon entfernt eine Impfung mit kompletter Abdeckung aller Typen zu realisieren (Rohde 2011; Papi und Contoli 2011).

Alle bisherigen Therapieansätze sind an den hohen Ansprüchen gescheitert, da sie entweder keine ausreichende Wirksamkeit und Abdeckung aller Rhinovirustypen oder nicht tolerierbare unerwünschte Arzneimittelwirkungen aufwiesen (Jacobs et al. 2013). Mit diesem Projekt wurde sich deswegen für eine neuartige Strategie mit einem Antisense-Molekül in Form eines DNAzyms entschieden um diese Hürden zu überwinden. Die Eigenschaften dieser Substanzgruppe eignen sich sehr gut für den Einsatz gegen Rhinoviren, da das virale Genom aus einem Einzelstrang-RNA-Molekül exakt der Zielstruktur dieser Substanzklasse entspricht (Palmenberg et al. 2009). Dadurch sind Antisense-Moleküle in der Lage, die genomische RNA der Rhinoviren direkt anzugreifen und über ihren Abbau potentiell den kompletten viralen Stoffwechsel zu unterbinden. Wird das virale Genom zerstört, so kann sich das Virus weder durch Replikation vermehren, noch können durch Translation virale Proteine gebildet werden, die der menschlichen Wirtszelle schaden könnten (Lim et al. 2008). Dabei agiert das Antisense-Molekül hochspezifisch, da es durch seine Zielsequenz selektiv eine bestimmte Stelle des Zielmoleküls erkennt und angreift (Santoro und Joyce 1998). Außerdem ergibt sich durch den intrazellulären Angriff auf das Genom der Vorteil, dass die hohe antigene Diversität der verschiedenen Rhinovirustypen – bedingt durch die Epitop-bildenden Kapsidproteine – umgangen wird. Jeder Sequenzabschnitt mit einer Purin-Pyrimidin-Basenabfolge auf der viralen RNA bildet zunächst eine mögliche Angriffsstelle für DNAzyme (Santoro und Joyce 1997). So konnten sie gezielt für Sequenzabschnitte mit großer Ähnlichkeit in allen Rhinovirustypen entworfen werden und erlauben dadurch eine breite Abdeckung. Dies ermöglichte die Suche nach potentiellen Schnittstellen innerhalb der 5'-UTR und der CRE Region. Beides sind hoch konservierte Sequenzelemente, die auf allen Rhinoviren vorhanden sind und dabei einen hohen Grad an Sequenzübereinstimmung aufweisen (Palmenberg et al. 2009). Diese Abschnitte bilden – neben der Möglichkeit einer breiten Abdeckung – außerdem interessante Zielstrukturen, da sie essentielle Aufgaben im viralen Lebenszyklus übernehmen (Lin et al. 2009). Selbst bei einer kleinen Beeinträchtigung der Funktion

dieser Sequenzabschnitte ist entsprechend mit einem großen Effekt auf die Proliferation des Virus zu rechnen.

Die vielversprechenden Eigenschaften der Antisense-Moleküle haben in den letzten Jahren zu vielen Entwicklungen und klinischen Testungen dieser Substanzen als neue therapeutische Mittel gegen unterschiedlichste Krankheitsbilder geführt. Die Krankheitsentitäten umfassen dabei maligne, infektiöse, metabolische, neurologische und chronisch entzündliche Leiden (Potaczek et al. 2016; Karnati et al. 2014). Bisher gibt es zwei von der US Food and Drug Administration zugelassene Antisense-Mittel: Fomivirsen, ein Oligonukleotid gegen Zytomegalie-Retinitis bei HIV-Patienten und Mipomersen, ein Oligonukleotid gegen Apolipoprotein B-100 bei homozygoter familiärer Hypercholesterinämie (Kastelein et al. 2006; Akdim et al. 2010). Ein Beispiel für einen DNAzym-basierten Therapieansatz in klinischer Testung ist das DNAzym hgd40 gegen den Transkriptionsfaktor *GATA3* zur Behandlung von Th2-gesteuertem Asthma (Homburg et al. 2015; Sel et al. 2008).

Die Fähigkeit, einen direkten und spezifischen Angriff auf virale RNA zu ermöglichen, ist allen Antisense-Strategien gemeinsam. Bei diesem Projekt wurde sich speziell für DNAzyme entschieden, da diese Molekülart auch gegenüber anderen Antisense-Strategien Vorteile bietet. Genau wie Ribozyme sind DNAzyme nicht auf weitere Moleküle angewiesen, um ihre Wirkung zu entfalten, sondern sind eigenständig katalytisch aktiv (Bhindi et al. 2007). Im Vergleich zu Ribozymen zeichnen sich DNAzyme durch günstigere Herstellungskosten, bessere *in vivo* Stabilität, größere Flexibilität in der Zielsequenzzusammensetzung und gleichwertig bis tendenziell höhere Reaktionsraten aus (Kurreck et al. 2002; Schubert und Kurreck 2004). Insbesondere die flexibleren Zielsequenzen ermöglichen spezifischere Spaltungsmöglichkeiten im Vergleich zu Ribozymen und damit einen großen Vorteil für die vorliegende Zielsetzung (Kuwabara et al. 1997).

## **4.1 Vorgehensweise und Schwierigkeiten bei der Entwicklung erfolgreicher DNAzyme**

Ein elementar wichtiger Punkt ist das Auffinden einer geeigneten Zielsequenz auf dem Zielmolekül. Grundsätzlich muss ein Sequenzabschnitt auf der Ziel-RNA ein Purin-Pyrimidin-Basenpaar enthalten, um als Schnittstelle für ein DNAzym vom 10-23-Typ in Frage zu kommen (Santoro und Joyce 1997). Jedoch ist nur ein kleiner Anteil von teilweise nur ca. 10% dieser potentiellen Schnittstellen tatsächlich für DNAzyme zugänglich (Cairns et al. 2003). Vorhersagen darüber, welche der eventuellen Schnittstellen wirklich geeignete Ziele darstellen, lassen sich ohne eine Testung nur sehr schlecht treffen. Der Grund für die unterschiedliche Zugänglichkeit liegt hauptsächlich

in der Beschaffenheit der Sekundär- und Tertiärstruktur des Substratmoleküls. Feste intramolekulare Basenpaarungen oder weitere mit dem RNA-Molekül interagierende Moleküle können die Anlagerung von DNAzymen verhindern (Sohail und Southern 2000). Die Anlagerung ist eine Voraussetzung, aber nicht alleine ausreichend für DNAzym-Aktivität (Kurreck et al. 2002). Selbst wenn ein DNAzym an die Zielsequenz bindet, muss zusätzlich ein katalytisch-aktiver Enzym-Substrat-Komplex formiert werden, dessen Ausbildung durch umliegende Strukturen behindert werden kann (Schubert et al. 2004). In Abhängigkeit der Basenzusammensetzung der Schnittstelle zeigen 10-23-DNAzyme außerdem unterschiedlich starke katalytische Aktivität. Beste Ergebnisse traten bei Schnittstellen mit der Basenzusammensetzung aus Guanin-Uracil oder Adenin-Uracil ein (Cairns et al. 2003). Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit eine systematische Screening Untersuchung durchgeführt, bei der alle potentiellen Guanin-Uracil Schnittstellen und ausgesuchte Adenin-Uracil Stellen in den vorher festgelegten Zielbereichen auf der viralen RNA von drei Testviren getestet wurden. Wie erwartet, zeigte nur eine Minderheit der getesteten DNAzyme nachweisbare Aktivität. Je nach untersuchtem Zielbereich unterschied sich der Anteil an funktionellen DNAzymen, was durch die unterschiedlich stark ausgeprägte Sekundärstruktur der Sequenzabschnitte erklärt werden kann. Die unterschiedliche Aktivität der funktionellen DNAzyme wurde in einem ersten Schritt qualitativ beurteilt, um im weiteren Verlauf die besten Kandidaten auswählen zu können.

Besonders erschwerend kam die hohe Diversität der zurzeit erfassten 322 Isolate von 137 unterschiedlichen Rhinovirustypen hinzu (McIntyre et al. 2013). Um alle Infektionen mit Rhinoviren abdecken zu können, musste das DNAzym deswegen für eine Schnittstelle entworfen werden, die DNAzym-Aktivität ermöglicht und gleichzeitig in möglichst allen Rhinovirusisolaten vorhanden ist. Dabei war es aufgrund der enorm hohen Anzahl an Rhinovirustypen nicht möglich, mit allen Virustypen experimentelle Untersuchungen durchzuführen. Als erste Strategie dienten in der Herangehensweise an dieses Problem das Design und die Versuche mit den drei unterschiedlichen Testviren. Nach der Screening-Untersuchung konnten die funktionellen Schnittstellen zwischen den verschiedenen Testviren anhand von Sequenzalignements miteinander verglichen werden. So wurden funktionelle Schnittstellen identifiziert, die in mehreren Testviren gleichzeitig vorhanden sind und entweder durch ein einzelnes DNAzym, oder durch eine Gruppe ähnlicher DNAzyme abgedeckt werden (siehe Tab. 18 und Tab. 19). Daraufhin folgte mit Hilfe der erstellten Virusgenom-Datenbank eine Überprüfung bei welchem Anteil der bekannten, aber nicht getesteten Virustypisolate ebenfalls die erforderlichen Zielsequenzen für die aktiven DNAzyme enthalten sind.



Die Auswertung der Screening-Untersuchung zeigte, dass in der CRE Region zwar viele funktionelle Schnittstellen für DNAzyme gefunden werden konnten, eine ausreichende Sequenzübereinstimmung aber weder für die Abdeckung aller Testviren, noch für eine ausreichende Anzahl an Virustypisolaten gegeben war. Hingegen konnten in der 5'-UTR einige DNAzym-Kandidaten identifiziert werden, die Aktivität zeigten und gleichzeitig eine große Anzahl der bekannten Virustypisolate abdeckten.

Bei den gefundenen Schnittstellen innerhalb der CRE Region zeigte sich dementsprechend wieder das Problem der hohen Diversität der unterschiedlichen Virustypen. Selbst innerhalb des eigentlich hoch konservierten Bereiches der CRE Region existieren zu viele Unterschiede zwischen den verschiedenen Virustypen, um eine einzelne, auf alle passende, Zielsequenz für ein DNAzym zu finden. Auch der Versuch, die Abdeckung der gefundenen funktionellen DNAzyme durch Kreuz-Aktivität bei nicht komplett komplementären Zielsequenzen zu verbessern, war nicht wirksam, bestätigte aber die hohe Sequenzspezifität der Moleküle.

Weitaus erfolgreicher war der Versuch, die Aktivität der DNAzyme in der 5'-UTR mit bereits gegebener ausgezeichneter Abdeckung durch eine Verlängerung der Bindungsarme zu verbessern. Die extrem hohe Konservierung der Virussequenz kann durch die wichtige Funktion im Bereich dieser Zielsequenzen begründet werden, welche in diesen Abschnitten komplexe Sekundärstrukturen in Form von Stamm-Schlaufen-Subdomänen formt (Witwer et al. 2001; Anderson et al. 2007a). Durch eine vergleichende Analyse der Zielsequenzen mit Modellen der Sekundärstruktur zeigte sich, dass die hochkonservierten Zielsequenzen der DNAzyme in den basalen Anteilen einer Stamm-Schlaufen-Subdomäne liegen. Dadurch sind einige Basen der Zielsequenz direkt für die DNAzyme zugänglich, während andere Abschnitte in der RNA-Sekundärstruktur gebunden sind. Um sich erfolgreich anzulagern und die RNA zu spalten, müssen die DNAzyme entsprechend bei der Anlagerung in der Lage sein die Sekundärstruktur der RNA aufzubrechen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht mit kompletten Virus-Genomen, sondern mit RNA-Fragmenten gearbeitet wurde, besaßen diese die benötigte Länge, um die entscheidende Stamm-Schlaufen-Subdomäne vollständig auszuformen. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Sekundärstruktur tatsächlich auch unter den Versuchsbedingungen erheblichen Einfluss auf die Aktivität der DNAzyme in dieser Region hat (siehe Abschnitt 3.3.2.4), die DNAzyme mit Zielsequenzen in der Basis der Stamm-Schlaufen-Subdomäne bei geeigneter Bindungsarmlänge aber trotzdem sehr gute Aktivität zeigen. Es kann angenommen werden, dass sich die DNAzyme zuerst an die frei zugänglichen Basen anlagern und dann in der Lage sind, die Sekundärstruktur aufzubrechen, um somit die gesamte Zielsequenz zu binden. Dafür ist es wichtig, dass beide Bindungsdomänen starke

Interaktionen mit der Ziel-RNA eingehen können. Um die ideale Länge der Bindungsdomänen herauszufinden, wurden quantitative Messungen der enzymatischen Aktivität mit allen potentiellen DNAzymen unterschiedlicher Bindungsarmlänge durchgeführt. So wurde für jedes DNAzym in dieser Position – Dua-01, Dua-02 und Dua-03 – die ideale Bindungsarmzusammensetzung ermittelt, bei der sowohl Aktivität als auch Abdeckung von Virustypisolaten am vielversprechendsten ist. Eine solche Vorgehensweise zum Auffinden funktioneller DNAzyme durch Berücksichtigung der vorliegenden Sekundärstruktur wird auch durch andere Studien unterstützt (Amarzguioui et al. 2000; Sioud 1997). Ebenso ist bekannt, dass die jeweilige Bindungskapazität direkt von der Sequenzzusammensetzung der Bindungsdomänen abhängig ist. Je nach Basenzusammensetzung (Guanin und Cytosin bilden stärkere, Adenin und Uracil schwächere Basenpaarungen aus) werden in der der Länge veränderte oder modifizierte Bindungsarme benötigt um ideale Bindungskapazität zu erreichen (Cairns et al. 1999). Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass die Dissoziation von der Substrat-RNA nach Zerschneiden des Ziel-Moleküls durch zu starke Interaktion behindert werden kann. Entsprechend wurden in der abschließenden Selektion der Bindungsdomänenlängen bei gleicher Aktivität immer die kürzere Variante bevorzugt (siehe 3.4.2.4).

Die sehr guten Ergebnisse der final selektierten DNAzyme mit starker Aktivität gegen alle Testviren und die Sequenzübereinstimmung mit über 98 Prozent aller bekannten Virustypisolate können jedoch nicht direkt auf den intrazellulären Einsatz bzw. auf das ultimative Ziel, die Behandlung von Patienten, übertragen werden. Es muss betont werden, dass die beobachteten Ergebnisse unter künstlichen Reaktionsbedingungen erreicht wurden. Dabei sollte die grundsätzliche Möglichkeit einer gezielten Bekämpfung von Rhinoviren mittels DNAzymen untersucht und die Basis für weiterführende Forschung gelegt werden. So war sichergestellt, dass ein Überschuss an DNAzym Molekülen direkt in Verbindung mit der Ziel-RNA treten konnte. Letztere bestand nicht aus kompletten Virusgenomsequenzen, sondern aus Fragmenten der ausgewählten Testviren. Auch die äußeren Reaktionsbedingungen *in vitro* entsprachen dabei nicht exakt denen im intrazellulären Milieu mit veränderlichen Temperaturen, Elektrolyt-konzentrationen und weiteren beeinflussenden Molekülen, wie bspw. den zellulären Proteinen. Trotzdem wurden die physiologischen Bedingungen durch den Versuchsaufbau *in vitro* weitestmöglich nachgestellt, um aussagekräftige Ergebnisse, auch im Hinblick auf einen zukünftigen intrazellulären Einsatz, zu erzielen.

Insbesondere die Konzentration der Magnesium-Ionen, welche als Kofaktoren großen Einfluss auf die Aktivität von 10-23-DNAzymen haben, lag in allen Versuchen mit einem Wert von 1 mM im Bereich der intrazellulär physiologischen Bedingungen

(Santoro und Joyce 1998; Murphy 2000; Jahnke-Dechent und Ketteler 2012). Damit wurde sich bewusst gegen, wie in anderen *in vitro* Testungen üblich, höhere Konzentrationen und entsprechend stärkere DNAzym-Aktivität entschieden, um validierte Aussagen über die mögliche katalytische Aktivität für spätere Untersuchungen intrazellulär treffen zu können (Schubert et al. 2003; Kurreck et al. 2002; Victor et al. 2017). Direkten Einfluss auf die DNAzym-Aktivität hat auch die Reaktionstemperatur, welche bei zukünftigen therapeutischen Einsätzen abhängig von der Position innerhalb der Atemwege an der infizierten Atemwegsschleimhaut schwanken könnte. Relevant für induzierte Asthmasymptome dürften Infektionen der unteren Atemwege bei der verwendeten Standard-Inkubationstemperatur für DNAzyme von 37°C sein (Papadopoulos et al. 2000). Wichtig ist aber auch, dass DNAzyme bei potentiell niedrigeren Temperaturen der oberen Atemwege funktionieren. Diese unterschiedlichen Bedingungen wurden berücksichtigt, indem neben 37°C auch Versuche bei 33°C durchgeführt wurden. Es zeigte sich, wie zu erwarten, eine etwas verminderte, aber immer noch gute Aktivität unter diesen veränderten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.5.2). Somit ist ein Einsatz der DNAzyme im Temperaturbereich von 33-37°C möglich und damit im kompletten Atemtrakt erfolgsversprechend.

Die virale RNA bestand aus Fragmenten der eigentlichen Virusgenome, jedoch waren die Virussequenzen mit einer Länge zwischen 498 und 703 Basen (je nach Testvirus und Region) alle in der Lage, über intramolekulare Basenpaarung eine Sekundärstruktur auszubilden. Dies zeigte sich in der fehlenden Aktivität vieler DNAzym-Kandidaten in der Screening-Phase und hatte vor allem Einfluss auf die benötigten Veränderungen, welche vorgenommen wurden, um die final selektierten DNAzyme (Dua-01, Dua-02 und Dua-03) in ihrer Aktivität zu verbessern. Somit wurde die komplexe Sekundärstruktur des hochkonservierten Zielabschnitts der 5'-UTR schon in dieser Arbeit berücksichtigt und stellt kein Hindernis für die final selektierten DNAzyme dar. In weiterführenden intrazellulären Versuchen und Einsätzen gegen vollständige Virus-Genome sollten somit allenfalls Proteine und andere Moleküle, die mit der RNA interagieren, zusätzlich die Bindung der DNAzyme an das Substrat behindern (Chen et al. 1997). Da die Zielsequenzen im Bereich der wichtigen IRES liegen, binden hier Ribosomen, zur Einleitung der Translation, und Proteine, teils zur Modulation dieses Prozesses, teils aus noch unbekannten Gründen (Jackson et al. 1990; Borman et al. 1993; Lin et al. 2009). Dennoch besteht eine sehr gute Chance, dass die DNAzyme, ähnlich wie Antisense-Oligonukleotide, mit ihren spezifischen und verlängerten Bindungsarmen in der Lage sind, hinsichtlich der Bindung an die virale RNA zu konkurrieren (Baker et al. 1997). Tatsächlich konnte ein Ansatz mit einem Antisense-Oligonukleotid an der exakt gleichen Stelle im Virusgenom bereits über eine sterische

Blockade, mit Verdrängung der Ribosomen und viralen Proteinen von ihren Bindungsstellen und ohne folgende Zerschneidung der RNA, signifikante Effekte *ex* und *in vivo* nachweisen (Stone et al. 2008).

Grundsätzlich muss beim Einsatz von Molekülen, die spezifisch eine bestimmte Struktur des Virus angreifen, mit der Entwicklung von Mutationen und daraus folgenden Resistenzen gegenüber dem angreifenden Molekül gerechnet werden (Gitlin et al. 2005; Kusov et al. 2006). Jedoch zeigt die hohe Sequenzübereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Virustypen an, dass in solchen Bereichen nur wenige Mutationen zu überlebensfähigen Mutanten führen. Die Viren scheinen auf den Erhalt der Sequenzbeschaffenheit – insbesondere im Bereich der extrem konservierten Zielsequenz der final ausgewählten DNAzyme – angewiesen und entsprechend ist die Gefahr für die Entwicklung von Resistenzen durch Sequenzmutationen vermindert (Stone et al. 2008).

Die verwendeten Testviren umfassten drei Vertreter von insgesamt 137 bekannten Virustypen. Mit diesen Viren, die sich in ihren Sequenzen und Eigenschaften unterscheiden (Zugehörigkeit zur Major und Minor Group) und bereits häufig in der Forschung verwendet wurden, fiel die Entscheidung auf entsprechend aussagekräftige Repräsentanten (Palmenberg und Gern 2015; Mallia et al. 2011; Andries et al. 1990). Die Abdeckung der restlichen Virustypen wurde basierend auf den Sequenzanalysen *in silico* mittels der erstellten Virusgenom-Datenbank beurteilt. Eine breitere direkte Testung und Berücksichtigung weiterer Testviren wäre zu aufwendig und teilweise, auf Grund der Nichtanzüchtbarkeit der Rhinoviruspezies C, unmöglich gewesen (Lau et al. 2010). Allerdings ist eine direkte Übertragbarkeit der Aktivität gegen die Testviren auf die ungetesteten Rhinovirustypen insbesondere für den Bereich der hochkonservierten Zielsequenzen sehr wahrscheinlich. Durch die extreme Sequenzhomologie herrschen hier für die DNAzyme mit allen Rhinoviren stark ähnliche Reaktionsvoraussetzungen. Dies bestätigte sich in den vorliegenden Testungen durch parallel positive Effekte der Veränderungen und die Möglichkeit zur Selektion der gleichen idealen Bindungsdomänenlängen in allen drei Testviren (siehe Abschnitt 3.4.1.4).

Die DNAzyme waren in den *in vitro* Versuchen im Überschuss vorhanden und zusätzlich nicht den Angriffen zellulärer Nukleasen ausgesetzt. Auch intrazellulär einen generellen Überschuss an DNAzymen gegenüber den sich bereits replizierenden Viren zu schaffen, ist unrealistisch. Allerdings ist vorstellbar, dass man mit einer frühen oder prophylaktischen Behandlung diese positiven Mengenverhältnisse insbesondere in noch nicht betroffenen Teilen des Atemtrakts erreicht, bevor sich die Infektion dorthin ausbreiten kann (Gern et al. 1997). Vorteilhaft ist dabei auch die Möglichkeit zur

direkten, lokalen und repetitiven Behandlung des Atemtrakts mittels inhalativer Gabe. Dabei wird die Ausbreitung des Mittels auf die gewünschten Bereiche beschränkt und lokal am Wirkort können hohe Dosen erreicht werden, während mögliche Nebenwirkungen durch systemische Verteilung verhindert werden (Guimond et al. 2008). Zusätzlich sind DNAzyme grundsätzlich in der Lage durch multiple Reaktionen eine Vielzahl an Substratmolekülen zu zerschneiden und können dadurch auch bei einem negativen Mengenverhältnis wirksam sein (Kurreck et al. 2002).

Beim Einsatz im Patienten – der eine hohe Sicherheit des Mittels voraussetzt – ist vorteilhaft, dass DNAzyme, mit ihrem Aufbau aus Nukleinsäuren, aus natürlich im Körper vorkommenden Substanzen bestehen und damit nicht toxisch für den Organismus sind. Im Körper vorhandene Nukleasen sind in der Lage, diese Moleküle schnell in ihre Einzelbausteine zu zerlegen, damit unwirksam zu machen und in den Stoffwechsel zu überführen. Trotzdem berichten einzelne Quellen von möglichen Nebenwirkungen durch Abbauprodukte der Nukleinsäuren in bestimmten Konzentrationen und Verhältnissen mit folgenden antiproliferativen Effekten (Vaerman et al. 1997; Koziolkiewicz et al. 2001). Diese Beobachtungen müssen ernst genommen und die entwickelten Moleküle darauf getestet werden. Sollten diese Effekte auftreten, kann durch Modifikation der Moleküle Einfluss darauf genommen werden, jedoch spielte diese Problematik in einer Vielzahl klinischer Studien keine Rolle (Dias und Stein 2002; Potaczek et al. 2016; Bhindi et al. 2007).

Um den schnellen Abbau der DNAzyme durch die körpereigenen Enzyme zu verlangsamen und damit einen erfolgsversprechenden Einsatz im menschlichen Organismus überhaupt zu ermöglichen, müssen die Moleküle leicht modifiziert werden (Schubert und Kurreck 2004). Für die weiterführenden Untersuchungen wurden deswegen – durch das Anheften eines invertierten Thymidins am 3'-Ende – modifizierte Moleküle entwickelt, die resistenter sind und trotzdem vergleichbare Aktivität zu den ursprünglichen DNAzymen zeigen konnten (siehe Abschnitt 3.5.3). Auf diese Weise modifizierte DNAzyme konnten schon in anderen Arbeiten erfolgreich eingesetzt werden (Sun et al. 1999; Dass et al. 2002; Yen et al. 1999). Dabei fungiert das invertierte Thymidin als einfacher Schutz vor Exonukleasen, welcher in Studien die Halbwertszeit getesteter DNAzyme von 2 auf über 20 Stunden erhöhen und somit die Stabilität der Moleküle um das Zehnfache steigern konnte (Schubert et al. 2003; Sun et al. 1999). Aufwendigere Modifikationen des Nukleinsäure-Rückgrads versprechen einen noch längeren Schutz und teilweise verbesserte Aktivität durch stärkere Affinität der modifizierten Basen zum Zielmolekül (Schubert et al. 2003). Beide Eigenschaften schienen allerdings für die hier final selektierten DNAzyme mit bereits ausgezeichneter Aktivität nicht notwendig, zumal Modifikationen mit unerwünschten Nebenwirkungen

einhergehen können (siehe unten). Die vorgenommene Modifikation hingegen bedeutet keine große Veränderung des ursprünglichen Moleküls und zeigte auch in anderen Untersuchungen nur geringen bis keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität (Schubert et al. 2003). Sind die DNAzyme relativ geschützt gegenüber katalytischem Abbau, kann sich die Anwesenheit von Nukleasen sogar positiv auf die Effektivität gegen die virale RNA auswirken. Antisense-Oligonukleotide entfalten ihre Wirkung unter anderem über die Rekrutierung der RNase H. Diese zelluläre Nuklease erkennt DNA-RNA-Heteroduplexe und baut den gebundenen RNA-Strang ab (Dias und Stein 2002). So kann auch virale RNA, die nur von den Bindungsdomänen des DNAzyms gebunden aber noch nicht erfolgreich zerschnitten wurde, durch zelluläre Nukleasen unschädlich gemacht werden (Heidenreich et al. 1996). Die Effektivität der DNAzyme würde durch diesen Synergismus mit zellulären Enzymen entsprechend gesteigert. Zusammenfassend soll das invertierte Thymidin so den notwendigen Schutz gegen zu schnellen Abbau bis zur Entfaltung der Aktivität gewährleisten und gleichzeitig aufwendigere Veränderungen und die damit einhergehende Erschaffung unnatürlicher, körperfremder Stoffe mit potentiell toxischen Effekten verhindern (Wahlestedt et al. 2000; Winkler et al. 2010).

Mögliche Nebenwirkungen durch den Einsatz von Antisense-Molekülen und DNAzymen im Speziellen lassen sich unterteilen in hybridisierungs-abhängig und unabhängig (Alton et al. 2012). Hybridisierungs-abhängige Fehlerkennungen menschlicher Nukleinsäuren mittels der entwickelten DNAzyme gegen virale RNA sind durch die sehr hohe Sequenzspezifität der Bindungsdomänen praktisch ausgeschlossen (Abdelgany et al. 2005; Levin 1999). Weitaus wahrscheinlicher ist das Auftreten hybridisierungs-unabhängiger Effekte, bedingt durch die chemische Struktur der verwendeten Moleküle. Diese sind nicht sequenzabhängig und daher generell auf gleichwertige Moleküle übertragbar (Jason et al. 2004). Immunzellen können mittels des Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9) unmethylierte CpG-Motive innerhalb von Nukleotid-Sequenzen erkennen und zu Zytokin-Ausschüttung, NK- und Th-Zell Aktivierung und Antikörperproduktion führen (Ioannou et al. 2002). Alle DNAzyme vom 10-23 Typ besitzen ein CpG-Motiv in ihrer katalytischen Domäne und je nach Zielsequenz eventuell weitere dieser Motive innerhalb der Bindungsdomänen (Santoro und Joyce 1997). So enthalten auch die hier final selektierten DNAzyme entweder ein (Dua-03-L6R12) oder zwei (Dua-01-L12R9 und Dua-02-L10R11) CpG-Motive. Ob es dadurch tatsächlich zu einer Immunreaktion kommt, ist jedoch auch von weiteren Faktoren, wie dem Nukleinsäure-Rückgrat und der restlichen Basensequenz abhängig (Krieg 1999). Tatsächlich ist sogar CpG-unabhängige TLR-Aktivierung möglich (Yasuda et al. 2006). Modifikationen des Nukleinsäure-Rückgrats sind eine weitverbreitete Technik, um

Antisense-Moleküle resistenter zu gestalten, gehen jedoch vor allem durch erhöhte Bindungskapazität zu Proteinen einher mit der Gefahr für unerwünschte Nebenwirkungen (Levin 1999; Stein und Colombini 2008). Bei hohen systemischen Konzentrationen können alle Antisense-Moleküle über Protein-Interaktionen wirksam werden und bspw. das Komplementsystem und die Gerinnung beeinflussen (Shaw et al. 1997).

Für die hier entwickelten DNAzyme gegen Rhinoviren sind, basierend auf den erfolgreichen Testungen des DNAzyms hgd40 gegen den Transkriptionsfaktor *GATA3* zur Gabe bei Th2-getriggertes Asthma, keine relevanten Nebenwirkungen in weiterführenden Testungen zu erwarten (Homburg et al. 2015). Hgd40 entspricht in seiner chemischen Struktur den hier untersuchten DNAzymen und wurde ebenso für eine inhalative Gabe mit lokalem Wirkungsort in den Atemwegen entwickelt (Sel et al. 2008). Trotz vorhandener CpG-Motive konnte für dieses DNAzym keinerlei Aktivierung verschiedenster angeborener Immunzellen nachgewiesen werden (Dicke et al. 2012). Mit der eventuellen Einschränkung leichter und komplett reversibler Immunparameterveränderungen bei höchsten Dosierungen, konnten in extensiven toxikologischen Untersuchungen weder lokale, noch systemische ungünstige Effekte beobachtet werden (Fuhst et al. 2013). Auch die Sicherstellung der Aufnahme in die Zellen des Atemtrakts – eine Hürde aus zahlreichen Zellversuchen mit Antisense-Strategien auf dem Weg zu einem therapeutischen Ansatz – scheint für DNAzyme bei inhalatorischer Gabe kein Problem darzustellen. DNAzyme mit einem 3'-invertierten Thymidin werden mittels einem Transfektions-Reagenz gut in Zellen aufgenommen und verbleiben auch nach 24 Stunden in aktiver Form (Dass et al. 2002). In Tierversuchen mit hgd40 konnte nach inhalatorischer Gabe des DNAzyms ohne zusätzliches Transfektions-Reagenz eine schnelle und gute Aufnahme in die Zellen des Atemtrakts, bei geringer systemischer Verteilung und guter Ausscheidung über den Urin nachgewiesen werden (Turowska et al. 2013).

## 4.2 Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit ist es gelungen, die Grundlagen für einen Therapieansatz gegen Rhinoviren zu legen, indem ein funktionelles DNAzym gegen die genomische RNA dieses Infektionserregers entwickelt wurde. Dieses Mittel wird nach weiteren erfolgreichen intrazellulären und klinischen Testungen, mit Bestätigung von Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil, potentiell mehrere verschiedene Einsatzmöglichkeiten haben.

Prinzipiell bietet es Aussicht auf eine kausale Therapie des häufigsten Erregers der banalen Erkältung. Trotz der meistens harmlosen, selbstlimitierenden Erkrankung, bereiten die mehrere Tage anhaltenden Symptome aus verstopfter, laufender Nase,

Husten, Kopf- und Rachenschmerzen den betroffenen Personen deutliche Beschwerden. Dadurch entstehen zusätzlich hohe sozioökonomische Kosten, etwa durch erkältungsbedingte Abwesenheit vom Arbeitsplatz oder inadäquate Antibiotika-Therapie (Bramley et al. 2002; Gonzales et al. 2001). Ob eine Therapie in dieser Patientengruppe mit niedrigem Risikoprofil tatsächlich positive Effekte hätte und damit sinnvoll wäre bleibt zu eruieren.

Insbesondere erscheint eine Therapie von Rhinovirus-Infektionen aber sinnvoll für bestimmte Risikogruppen, bei denen die Erkrankungen kompliziert verlaufen. Bei Säuglingen und kleinen Kindern könnten schwere Infektionen der unteren Atemwege, wie Bronchiolitiden, Bronchitiden und Pneumonien durch diese Erreger therapiert und somit ggf. Krankenhausaufenthalte bis hin zu Intensivbehandlungen verhindert werden (Renwick et al. 2007). Für immunsupprimierte Patienten wäre ein Mittel gegen potentiell tödlich verlaufende Infektionen verfügbar (Gutman et al. 2007).

Eine große Belastung für viele betroffene Patienten und für die Gesundheitssysteme weltweit sind Infektionen mit Rhinoviren vor allem dann, wenn sie Menschen mit chronischen Atemwegserkrankungen betreffen. In diesen Fällen verlaufen Infektionen der unteren Atemwege mit deutlich stärkeren Symptomen und sind von längerer Dauer, als bei gesunden Vergleichspersonen (Corne et al. 2002). Dies ist der häufigste Grund für eine Exazerbation der Grunderkrankung und folgender stärkster Belastung der Patienten (Gern 2010). Aktuell fehlt hier eine kausale Therapie und man ist, mit teilweise ausbleibendem Erfolg, darauf angewiesen die symptomatische Therapie zu eskalieren (Doull et al. 1997; Oommen et al. 2003; Reddel und Barnes 2006). Damit steigt die Gefahr für unerwünschte Arzneimittelwirkungen, ohne dass der eigentlich verantwortliche Auslöser des veränderten Krankheitszustandes bekämpft wird. Die entwickelten DNAszyme greifen die Rhinoviren als Auslöser der Exazerbation hingegen direkt an.

Durch die Behandlung von giemenden Rhinovirus-Infektionen in der Kindheit wäre es eventuell außerdem möglich, den Fortschritt einer asthmatischen Erkrankung in ihrer Entwicklung zu verlangsamen oder sogar zu verhindern. Die kindliche Lunge ist sehr sensibel und vulnerabel, sodass exogene Einflüsse durch Infektionen zu diesem Zeitpunkt einen großen Einfluss auf ihre Entwicklung haben können (Gern et al. 2005). Die aktuelle Controller-Therapie ist nicht in der Lage, die Entwicklung von Asthma aufzuhalten. Die Symptome werden während der Einnahme zwar unterdrückt, treten dann aber nach Beendigung der Therapie wieder auf (Bisgaard et al. 2006; Guilbert et al. 2006). Hier besteht Aussicht auf eine Beeinflussung dieses Prozesses, da die wiederkehrenden Infektionen im Kindesalter spezifisch behandelt und dadurch die Anregung der Entzündungsreaktion verhindert werden könnten (Holt 2011).



## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Asthma bronchiale ist ein heterogenes Krankheitsbild aus wiederkehrender Obstruktion der unteren Atemwege, bedingt durch Hyperreagibilität der Atemwegsmuskulatur, Hypersekretion und entzündlicher Ödembildung in der Schleimhaut, das weltweit über 300 Millionen Menschen betrifft. Oft beginnt die Krankheit in jungen Jahren und betrifft als chronisches Leiden ohne kurative Therapie alle Altersgruppen. Die exakten Mechanismen und Gründe der Entstehung sind seit vielen Jahren Thema der Forschung, wobei das Zusammenspiel aus genetischer Disposition und Umwelteinflüssen als wichtigste Faktoren gesichert ist. Mit konstant hohen Erkrankungsraten in den industrialisierten Nationen und steigenden Prävalenzen in den Entwicklungsländern geht Asthma mit hohen Kosten für die Gesundheitssysteme weltweit einher. Hohe Anteile der Kosten und der Belastung für die betroffenen Patienten gehen zurück auf Asthmaexazerbationen, mit einhergehendem Bedarf für Notfall-Behandlungen und Krankenhauseinweisungen, am häufigsten ausgelöst durch die Infektion mit humanen Rhinoviren. Gegen diese Erreger der banalen Erkältung existiert bisher keine etablierte Therapie. Mit ihrem Genom aus einem positiven Einzelstrang-RNA-Molekül bieten sie ein mögliches Ziel für Antisense-Moleküle, speziell für DNAsen, welche in den letzten Jahren vermehrt erfolgreich in der Forschung und in klinischen Studien eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden DNAsen gegen Abschnitte innerhalb der 5'-untranslatierten Region und des CRE-Elements von drei repräsentativen Testviren entwickelt und auf *in vitro* Aktivität geprüft. Die Moleküle waren in der Lage, die virale RNA spezifisch zu schneiden. Mittels Erstellung einer *in silico* Datenbank war es in einem zweiten Schritt möglich, die restlichen nicht unmittelbar getesteten Virustypen auf das Vorkommen der gefundenen Schnittstellen zu überprüfen. Hier offenbarte sich das Problem von stark aktiven DNAsen für einzelne Virustypen ohne breite Abdeckung der Gesamtheit einerseits, und DNAsen mit breiter Abdeckung fast aller Virustypen aber geringer Aktivität andererseits.

Als Ursache für die unterschiedliche Aktivität konnte die Sekundärstruktur des Virusgenoms identifiziert und im nächsten Schritt durch Modifikation der DNAsen-Bindungsdomänenlänge die Abdeckung der verschiedenen Virustypen und die Spaltungsaktivität optimiert werden. So ist es gelungen vielversprechende DNAsen zu selektieren, die in der Lage sind, mit ausgezeichneter Spaltungsaktivität über 98 Prozent der bekannten Virustypisolate anzugreifen.

Diese Moleküle können nun in weiteren Experimenten *in vivo* eingesetzt und getestet werden, um in Zukunft ein gezieltes Mittel gegen Erkältungsviren und durch sie hervorgerufene Asthmaexazerbationen zu ermöglichen.

## 6 ABSTRACT

Asthma is a heterogeneous syndrome of recurrent obstruction in the lower airways caused by hyperreactivity of the airway muscles, hypersecretion and inflammatory edema in the mucous membrane, which affects over 300 million people worldwide. The disease often starts at a young age and affects all age groups as a chronic disease without curative therapy. The exact mechanisms and reasons for development have been the subject of research for many years and have assured the interaction of genetic disposition and environmental influences as the most important factors. With constantly high disease rates in industrialized nations and increasing prevalence in developing countries, asthma is associated with high costs for healthcare systems worldwide. High proportions of costs and burden for the affected patients are due to asthma exacerbations, with associated need for emergency treatment and hospital admissions, most often triggered by infection with human rhinoviruses. So far there is no established therapy against these pathogens of the common cold. With their genome consisting of a positive single strand RNA molecule, they offer a potential target for antisense molecules, in particular for DNA enzymes, which have increasingly been used successfully in research and clinical studies in recent years. In this work, DNA enzymes were developed against sections within the 5'-untranslated region and the CRE element of three representative viruses and tested for *in vitro* activity. The molecules were able to specifically cleave the viral RNA. By creating an *in silico* database it was in a second step possible to check the remaining, not directly tested virus types for the presence of the found cleavage sites. This revealed the problem of highly active DNA enzymes for individual virus types without broad coverage of the whole on the one hand, and DNA enzymes with broad coverage of almost all virus types but low activity on the other. The secondary structure of the virus genome was identified as the cause for differing activity and coverage between virus types. In a next step the cleavage activity could be optimised by modifying the DNA enzyme binding domain length. Likewise, it has been possible to select promising DNA enzymes that are able to attack over 98 percent of known virus type isolates with excellent cleavage activity. These molecules can now be used and tested in further *in vivo* experiments to provide a targeted cure for cold viruses and the asthma exacerbations they cause.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdelgany, A.; Ealing, J.; Wood, M.; Beeson, D. (2005): Selective DNzyme-mediated cleavage of AChR mutant transcripts by targeting the mutation site or through mismatches in the binding arm. In: *J RNAi Gene Silencing* 1 (1), S. 32–37.
- Agache, I.; Akdis, C. (2016): Endotypes of allergic diseases and asthma. An important step in building blocks for the future of precision medicine. In: *Allergy international: official journal of the Japanese Society of Allergology* 65 (3), S. 243–252.
- Akdim, F.; Visser, M.; Tribble, D.; Baker, B.; Stroes, E.; Yu, R. et al. (2010): Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. In: *The American journal of cardiology* 105 (10), S. 1413–1419.
- Allakhverdi, Z.; Comeau, M.; Jessup, H.; Yoon, B.-R.; Brewer, A.; Chartier, S. et al. (2007): Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. In: *The Journal of experimental medicine* 204 (2), S. 253–258.
- Alton, E.; Boushey, H.; Garn, H.; Green, F.; Hodges, M.; Martin, R. et al. (2012): Clinical expert panel on monitoring potential lung toxicity of inhaled oligonucleotides. Consensus points and recommendations. In: *Nucleic acid therapeutics* 22 (4), S. 246–254.
- Amarzguioui, M.; Brede, G.; Babaie, E.; Grotli, M.; Sproat, B.; Prydz, H. (2000): Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. In: *Nucleic Acids Res.* 28 (21), S. 4113–4124.
- Amineva, S.; Aminev, A.; Palmenberg, A.; Gern, J. (2004): Rhinovirus 3C protease precursors 3CD and 3CD' localize to the nuclei of infected cells. In: *The Journal of general virology* 85 (Pt 10), S. 2969–2979.
- Anderson, E.; Hunt, S.; Jackson, R. (2007a): Internal initiation of translation from the human rhinovirus-2 internal ribosome entry site requires the binding of Unr to two distinct sites on the 5' untranslated region. In: *J. Gen. Virol.* 88 (Pt 11), S. 3043–3052.
- Anderson, G. (2008): Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. In: *Lancet* 372 (9643), S. 1107–1119.
- Anderson, H.; Gupta, R.; Strachan, D.; Limb, E. (2007b): 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. In: *Thorax* 62 (1), S. 85–90.

- Andries, K.; Dewindt, B.; Snoeks, J.; Wouters, L.; Moereels, H.; Lewi, P.; Janssen, P. (1990): Two groups of rhinoviruses revealed by a panel of antiviral compounds present sequence divergence and differential pathogenicity. In: *Journal of virology* 64 (3), S. 1117–1123.
- Arden, K.; Chang, A.; Lambert, S.; Nissen, M.; Sloots, T.; Mackay, I. (2010): Newly identified respiratory viruses in children with asthma exacerbation not requiring admission to hospital. In: *J. Med. Virol.* 82 (8), S. 1458–1461.
- Ashraf, S.; Brockman-Schneider, R.; Bochkov, Y.; Pasic, T.; Gern, J. (2013): Biological characteristics and propagation of human rhinovirus-C in differentiated sinus epithelial cells. In: *Virology* 436 (1), S. 143–149.
- Bacharier, L.; Jabara, H.; Geha, R. (1998): Molecular mechanisms of immunoglobulin E regulation. In: *International archives of allergy and immunology* 115 (4), S. 257–269.
- Bahadori, K.; Doyle-Waters, M.; Marra, C.; Lynd, L.; Alasaly, K.; Swiston, J.; FitzGerald, J. (2009): Economic burden of asthma. A systematic review. In: *BMC pulmonary medicine* 9, S. 24.
- Bai, T.; Vonk, J.; Postma, D.; Boezen, H. (2007): Severe exacerbations predict excess lung function decline in asthma. In: *The European respiratory journal* 30 (3), S. 452–456.
- Baker, B.; Lot, S.; Condon, T.; Cheng-Flournoy, S.; Lesnik, E.; Sasmor, H.; Bennett, C. (1997): 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. In: *J. Biol. Chem.* 272 (18), S. 11994–12000.
- Banuelos, J.; Shin, S.; Cao, Y.; Bochner, B.; Morales-Nebreda, L.; Budinger, G. et al. (2016): BCL-2 protects human and mouse Th17 cells from glucocorticoid-induced apoptosis. In: *Allergy* 71 (5), S. 640–650.
- Barnes, P. (2008): Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (3), S. 183–192.
- Barnes, P. (2010a): Inhaled Corticosteroids. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 3 (3), S. 514–540.
- Barnes, P. (2010b): New therapies for asthma: is there any progress? In: *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (7), S. 335–343.
- Bateman, E.; Buhl, R.; O'Byrne, P.; Humbert, M.; Reddel, H.; Sears, M. et al. (2015): Development and validation of a novel risk score for asthma exacerbations. The risk score for exacerbations. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 135 (6), 1457-64.e4.

- Bateman, E.; Reddel, H.; Eriksson, G.; Peterson, S.; Ostlund, O.; Sears, M. et al. (2010): Overall asthma control. The relationship between current control and future risk. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (3), 600-8, 608.e1-608.e6.
- Beard, J.; Bearden, A.; Striker, R. (2011): Vitamin D and the anti-viral state. In: *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 50 (3), S. 194–200.
- Becker, M.; Hübner, R.-H.; Suttorp, N. (2012): Asthma bronchiale. In: M. Dietel, N. Suttorp und Zeitz M. (Hg.): *Harrisons innere Medizin*. 18. Aufl., dt. Ausg. in Zusammenarb. mit der Charité. Berlin: ABW-Wissenschaftsverl. (2), S. 2262–2278.
- Bhindi, R.; Fahmy, R.; Lowe, H.; Chesterman, C.; Dass, C.; Cairns, M. et al. (2007): Brothers in arms: DNA enzymes, short interfering RNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene-silencing strategies. In: *Am. J. Pathol.* 171 (4), S. 1079–1088.
- Bisgaard, H.; Hermansen, M.; Buchvald, F.; Loland, L.; Halkjaer, L.; Bønnelykke, K. et al. (2007): Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates. In: *The New England journal of medicine* 357 (15), S. 1487–1495.
- Bisgaard, H.; Hermansen, M.; Loland, L.; Halkjaer, L.; Buchvald, F. (2006): Intermittent inhaled corticosteroids in infants with episodic wheezing. In: *The New England journal of medicine* 354 (19), S. 1998–2005.
- Bizzintino, J.; Lee, W.-M.; Laing, I.; Vang, F.; Pappas, T.; Zhang, G. et al. (2011): Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. In: *The European respiratory journal* 37 (5), S. 1037–1042.
- Blaas, D. (2016): Wege des Viruseintritts. Am Beispiel der Erkältungsviren. In: *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 166 (7-8), S. 211–226.
- Blakey, J.; Woolnough, K.; Fellows, J.; Walker, S.; Thomas, M.; Pavord, I. (2013): Assessing the risk of attack in the management of asthma. A review and proposal for revision of the current control-centred paradigm. In: *Primary care respiratory journal: journal of the General Practice Airways Group* 22 (3), S. 344–352.
- Bochkov, Y.; Watters, K.; Ashraf, S.; Griggs, T.; Devries, M.; Jackson, D. et al. (2015): Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (17), S. 5485–5490.
- Bønnelykke, K.; Sleiman, P.; Nielsen, K.; Kreiner-Møller, E.; Mercader, J.; Belgrave, D. et al. (2014): A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. In: *Nature genetics* 46 (1), S. 51–55.

- Borman, A.; Howell, M.; Patton, J.; Jackson, R. (1993): The involvement of a spliceosome component in internal initiation of human rhinovirus RNA translation. In: *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 9), S. 1775–1788.
- Bousquet, J.; Jeffery, P.; Busse, W.; Johnson, M.; Vignola, A. (2000): Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 161 (5), S. 1720–1745.
- Bramley, T.; Lerner, D.; Sames, M. (2002): Productivity losses related to the common cold. In: *Journal of occupational and environmental medicine* 44 (9), S. 822–829.
- Braun-Fahrländer, C.; Riedler, J.; Herz, U.; Eder, W.; Waser, M.; Grize, L. et al. (2002): Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. In: *The New England journal of medicine* 347 (12), S. 869–877.
- Breaker, R.; Joyce, G. (1994): A DNA enzyme that cleaves RNA. In: *Chem. Biol.* 1 (4), S. 223–229.
- Brusselle, G.; Maes, T.; Bracke, K. (2013): Eosinophils in the spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. In: *Nat. Med.* 19 (8), S. 977–979.
- Cairns, M.; Hopkins, T.; Witherington, C.; Wang, L.; Sun, L. (1999): Target site selection for an RNA-cleaving catalytic DNA. In: *Nat. Biotechnol.* 17 (5), S. 480–486.
- Cairns, M.; King, A.; Sun, L.-Q. (2003): Optimisation of the 10-23 DNAzyme-substrate pairing interactions enhanced RNA cleavage activity at purine-cytosine target sites. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (11), S. 2883–2889.
- Calvo, C.; Casas, I.; García-García, M.; Pozo, F.; Reyes, N.; Cruz, N. et al. (2010): Role of rhinovirus C respiratory infections in sick and healthy children in Spain. In: *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29 (8), S. 717–720.
- Carroll, A.; Wong, Jonathan P.; Cairns, M. (2007): Designs and antiviral activity of gene-based drugs. In: A. Méndez-Vilas (Hg.): Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. Badajoz: Formatex (Microbiology series, vol. 2), S. 902–914. Online verfügbar unter <http://www.formatex.org/microbio/pdf/pages902-914.pdf>.
- Casasnovas, J.; Springer, T. (1994): Pathway of rhinovirus disruption by soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). An intermediate in which ICAM-1 is bound and RNA is released. In: *Journal of virology* 68 (9), S. 5882–5889.
- Chen, H.; Ferbeyre, G.; Cedergren, R. (1997): Efficient hammerhead ribozyme and antisense RNA targeting in a slow ribosome Escherichia coli mutant. In: *Nat. Biotechnol.* 15 (5), S. 432–435.

- Chung, K.; Wenzel, S.; Brozek, J.; Bush, A.; Castro, M.; Sterk, P. et al. (2014): International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. In: *The European respiratory journal* 43 (2), S. 343–373.
- Colunno, R.; Condra, J.; Mizutani, S.; Callahan, P.; Davies, M.; Murcko, M. (1988): Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (15), S. 5449–5453.
- Conant, R.; Hamparian, V. (1968): Rhinoviruses: basis for a numbering system. II. Serologic characterization of prototype strains. In: *J. Immunol.* 100 (1), S. 114–119.
- Contoli, M.; Message, S.; Laza-Stanca, V.; Edwards, M.; Wark, Peter A B; Bartlett, N. et al. (2006): Role of deficient type III interferon-lambda production in asthma exacerbations. In: *Nature medicine* 12 (9), S. 1023–1026.
- Corne, J.; Djukanovic, R.; Thomas, L.; Warner, J.; Botta, L.; Grandordy, B. et al. (1997): The effect of intravenous administration of a chimeric anti-IgE antibody on serum IgE levels in atopic subjects. Efficacy, safety, and pharmacokinetics. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (5), S. 879–887.
- Corne, J.; Marshall, C.; Smith, S.; Schreiber, J.; Sanderson, G.; Holgate, S.; Johnston, S. (2002): Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. In: *Lancet* 359 (9309), S. 831–834.
- Couch, R.; Cate, T.; Douglas, R.; Gerone, P.; Knight, V. (1966): Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission. In: *Bacteriological reviews* 30 (3), S. 517–529.
- Cox, D.; Bizzintino, J.; Ferrari, G.; Khoo, S.; Zhang, G.; Whelan, S. et al. (2013): Human rhinovirus species C infection in young children with acute wheeze is associated with increased acute respiratory hospital admissions. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 188 (11), S. 1358–1364.
- Daley, D. (2014): The evolution of the hygiene hypothesis: the role of early-life exposures to viruses and microbes and their relationship to asthma and allergic diseases. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 14 (5), S. 390–396.
- Dass, C.; Saravolac, E.; Li, Y.; Sun, L.-Q. (2002): Cellular uptake, distribution, and stability of 10-23 deoxyribozymes. In: *Antisense & nucleic acid drug development* 12 (5), S. 289–299.
- Dias, N.; Stein, C. (2002): Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. In: *Mol. Cancer Ther.* 1 (5), S. 347–355.
- Dicke, T.; Pali-Schöll, I.; Kaufmann, A.; Bauer, S.; Renz, H.; Garn, H. (2012): Absence of unspecific innate immune cell activation by GATA-3-specific DNazymes. In: *Nucleic acid therapeutics* 22 (2), S. 117–126.

- Dominguez, S.; Briese, T.; Palacios, G.; Hui, J.; Villari, J.; Kapoor, V. et al. (2008): Multiplex MassTag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade. In: *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 43 (2), S. 219–222.
- Doudna, J.; Cech, T. (2002): The chemical repertoire of natural ribozymes. In: *Nature* 418 (6894), S. 222–228.
- Doull, I.; Lampe, F.; Smith, S.; Schreiber, J.; Freezer, N.; Holgate, S. (1997): Effect of inhaled corticosteroids on episodes of wheezing associated with viral infection in school age children. Randomised double blind placebo controlled trial. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 315 (7112), S. 858–862.
- Eder, W.; Ege, M.; Mutius, E. von (2006): The asthma epidemic. In: *The New England journal of medicine* 355 (21), S. 2226–2235.
- Edlmayr, J.; Niespodziana, K.; Popow-Kraupp, T.; Krzyzanek, V.; Focke-Tejkl, M.; Blaas, D. et al. (2011): Antibodies induced with recombinant VP1 from human rhinovirus exhibit cross-neutralisation. In: *The European respiratory journal* 37 (1), S. 44–52.
- Edwards, M.; Bartlett, N.; Hussell, T.; Openshaw, P.; Johnston, S. (2012): The microbiology of asthma. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (7), S. 459–471.
- Ege, M.; Mayer, M.; Normand, A.-C.; Genuneit, J.; Cookson, William O C M; Braun-Fahrlander, C. et al. (2011): Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. In: *The New England journal of medicine* 364 (8), S. 701–709.
- Elbashir, S.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. In: *Nature* 411 (6836), S. 494–498.
- Ernst, P.; Cai, B.; Blais, L.; Suissa, S. (2002): The early course of newly diagnosed asthma. In: *The American Journal of Medicine* 112 (1), S. 44–48.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.; Kostas, S.; Driver, S.; Mello, C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811.
- Fuchs, R.; Blaas, D. (2010): Uncoating of human rhinoviruses. In: *Reviews in medical virology* 20 (5), S. 281–297.
- Fuhst, R.; Runge, F.; Buschmann, J.; Ernst, H.; Praechter, C.; Hansen, T. et al. (2013): Toxicity profile of the GATA-3-specific DNAzyme hgd40 after inhalation exposure. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 26 (2), S. 281–289.



- Galli, S.; Kalesnikoff, J.; Grimbaldston, M.; Piliponsky, A.; Williams, C.; Tsai, M. (2005): Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells. Recent advances. In: *Annual review of immunology* 23, S. 749–786.
- Gamarnik, A.; Andino, R. (1998): Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. In: *Genes Dev.* 12 (15), S. 2293–2304.
- Gerber, K.; Wimmer, E.; Paul, A. (2001): Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2A(pro). In: *J. Virol.* 75 (22), S. 10979–10990.
- Gern, J. (2009): Rhinovirus and the initiation of asthma. In: *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9 (1), S. 73–78.
- Gern, J. (2010): The ABCs of rhinoviruses, wheezing, and asthma. In: *Journal of virology* 84 (15), S. 7418–7426.
- Gern, J. (2015): How rhinovirus infections cause exacerbations of asthma. In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 45 (1), S. 32–42.
- Gern, J.; Galagan, D.; Jarjour, N.; Dick, E.; Busse, W. (1997): Detection of rhinovirus RNA in lower airway cells during experimentally induced infection. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 155 (3), S. 1159–1161.
- Gern, J.; Rosenthal, L.; Sorkness, R.; Lemanske, R. (2005): Effects of viral respiratory infections on lung development and childhood asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 115 (4), 668-74; quiz 675.
- Gitlin, L.; Stone, J.; Andino, R. (2005): Poliovirus escape from RNA interference. Short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. In: *Journal of virology* 79 (2), S. 1027–1035.
- Global Initiative for Asthma (Hg.) (2017): Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Online verfügbar unter <http://www.ginasthma.org/>, zuletzt geprüft am 23.08.2017.
- Gonzales, R.; Malone, D.; Maselli, J.; Sande, M. (2001): Excessive antibiotic use for acute respiratory infections in the United States. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 33 (6), S. 757–762.
- Greve, J.; Davis, G.; Meyer, A.; Forte, C.; Yost, S.; Marlbor, C. et al. (1989): The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. In: *Cell* 56 (5), S. 839–847.
- Gudbjartsson, D.; Bjornsdottir, U.; Halapi, E.; Helgadottir, A.; Sulem, P.; Jonsdottir, G. et al. (2009): Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. In: *Nature genetics* 41 (3), S. 342–347.

- Guilbert, T.; Morgan, W.; Zeiger, R.; Mauger, D.; Boehmer, S.; Szeffler, S. et al. (2006): Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma. In: *The New England journal of medicine* 354 (19), S. 1985–1997.
- Guimond, A.; Viau, E.; Aubé, P.; Renzi, P.; Paquet, L.; Ferrari, N. (2008): Advantageous toxicity profile of inhaled antisense oligonucleotides following chronic dosing in non-human primates. In: *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 21 (6), S. 845–854.
- Gutman, J.; Peck, A.; Kuypers, J.; Boeckh, M. (2007): Rhinovirus as a cause of fatal lower respiratory tract infection in adult stem cell transplantation patients. A report of two cases. In: *Bone marrow transplantation* 40 (8), S. 809–811.
- Hahn, Helmut (Hg.) (2012): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7., überarb. Aufl. Berlin: Springer Berlin (Springer-Lehrbuch).
- Hamilton, A.; Baulcombe, D. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5441), S. 950–952.
- Hamparian, V.; Colonno, R.; Cooney, M.; Dick, E.; Gwaltney, J.; Hughes, J. et al. (1987): A collaborative report. Rhinoviruses-extension of the numbering system from 89 to 100. In: *Virology* 159 (1), S. 191–192.
- Hannon, G. (2002): RNA interference. In: *Nature* 418 (6894), S. 244–251.
- Harris, J.; Gwaltney, J. (1996): Incubation periods of experimental rhinovirus infection and illness. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 23 (6), S. 1287–1290.
- Harrison, T.; Osborne, J.; Newton, S.; Tattersfield, A. (2004): Doubling the dose of inhaled corticosteroid to prevent asthma exacerbations. Randomised controlled trial. In: *Lancet* 363 (9405), S. 271–275.
- Haseloff, J.; Gerlach, W. (1988): Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. In: *Nature* 334 (6183), S. 585–591.
- Hayden, F.; Herrington, D.; Coats, T.; Kim, K.; Cooper, E.; Villano, S. et al. (2003a): Efficacy and safety of oral pleconaril for treatment of colds due to picornaviruses in adults. Results of 2 double-blind, randomized, placebo-controlled trials. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 36 (12), S. 1523–1532.
- Hayden, F.; Kaiser, D.; Albrecht, J. (1988): Intranasal recombinant alfa-2b interferon treatment of naturally occurring common colds. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 32 (2), S. 224–230.
- Hayden, F.; Turner, R.; Gwaltney, J.; Chi-Burris, K.; Gersten, M.; Hsyu, P. et al. (2003b): Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of

- rupintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47 (12), S. 3907–3916.
- Heidenreich, O.; Xu, X.; Swiderski, P.; Rossi, J.; Nerenberg, M. (1996): Correlation of activity with stability of chemically modified ribozymes in nuclei suspension. In: *Antisense & nucleic acid drug development* 6 (2), S. 111–118.
- Heikkinen, T.; Järvinen, A. (2003): The common cold. In: *The Lancet* 361 (9351), S. 51–59.
- Hellen, C.; Kraeusslich, H.; Wimmer, E. (1989): Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. In: *Biochemistry* 28 (26), S. 9881–9890.
- Hendley, J.; Wenzel, R.; Gwaltney, J. (1973): Transmission of rhinovirus colds by self-inoculation. In: *N. Engl. J. Med.* 288 (26), S. 1361–1364.
- Hilty, M.; Burke, C.; Pedro, H.; Cardenas, P.; Bush, A.; Bossley, C. et al. (2010): Disordered microbial communities in asthmatic airways. In: *PloS one* 5 (1), e8578.
- Hofer, F.; Gruenberger, M.; Kowalski, H.; Machat, H.; Huettinger, M.; Kuechler, E.; Blass, D. (1994): Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor-group common cold virus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (5), S. 1839–1842.
- Holgate, S.; Polosa, R. (2008): Treatment strategies for allergy and asthma. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (3), S. 218–230.
- Holt, P. (2011): Infection and the development of allergic disease. In: *Allergy* 66 Suppl 95, S. 13–15.
- Homburg, U.; Renz, H.; Timmer, W.; Hohlfeld, J.; Seitz, F.; Lüer, K. et al. (2015): Safety and tolerability of a novel inhaled GATA3 mRNA targeting DNAzyme in patients with TH2-driven asthma. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 136 (3), S. 797–800.
- Hughes, J.; Thomas, D.; Hamparian, V. (1973): Acid Lability of Rhinovirus Type 14. Effect of pH, Time, and Temperature. In: *Experimental Biology and Medicine* 144 (2), S. 555–560.
- Hutvágner, G.; Zamore, P. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5589), S. 2056–2060.
- Illi, S.; Mutius, E. von; Lau, S.; Niggemann, B.; Grüber, C.; Wahn, U. (2006): Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children. A birth cohort study. In: *Lancet* 368 (9537), S. 763–770.
- Ioannou, X.; Gomis, S.; Karvonen, B.; Hecker, R.; Babiuk, L.; van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2002): CpG-containing oligodeoxynucleotides, in combination with conventional adjuvants, enhance the magnitude and change the bias of the immune responses to a herpesvirus glycoprotein. In: *Vaccine* 21 (1-2), S. 127–137.

- Ivanova, J.; Bergman, R.; Birnbaum, H.; Colice, G.; Silverman, R.; McLaurin, K. (2012): Effect of asthma exacerbations on health care costs among asthmatic patients with moderate and severe persistent asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 129 (5), S. 1229–1235.
- Iwane, M.; Prill, M.; Lu, X.; Miller, E.; Edwards, K.; Hall, C. et al. (2011): Human rhinovirus species associated with hospitalizations for acute respiratory illness in young US children. In: *J. Infect. Dis.* 204 (11), S. 1702–1710.
- Jackson, D.; Evans, M.; Gangnon, R.; Tisler, C.; Pappas, T.; Lee, W.-M. et al. (2012): Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 185 (3), S. 281–285.
- Jackson, D.; Gangnon, R.; Evans, M.; Roberg, K.; Anderson, E.; Pappas, T. et al. (2008): Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 178 (7), S. 667–672.
- Jackson, R.; Howell, M.; Kaminski, A. (1990): The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. In: *Trends in biochemical sciences* 15 (12), S. 477–483.
- Jacobs, S.; Lamson, D.; St George, K.; Walsh, T. (2013): Human rhinoviruses. In: *Clin. Microbiol. Rev.* 26 (1), S. 135–162.
- Jahnen-Dechent, W.; Ketteler, M. (2012): Magnesium basics. In: *Clinical Kidney Journal* 5 (Suppl 1), i3-i14.
- Jason, T.; Koropatnick, J.; Berg, R. (2004): Toxicology of antisense therapeutics. In: *Toxicology and applied pharmacology* 201 (1), S. 66–83.
- Jefferson, T.; Del Mar, C.; Dooley, L.; Ferroni, E.; Al-Ansary, L.; Bawazeer, G. et al. (2011): Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (7), CD006207.
- Johnston, S.; Pattemore, P.; Sanderson, G.; Smith, S.; Lampe, F.; Josephs, L. et al. (1995): Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9–11 year old children. In: *BMJ* 310 (6989), S. 1225–1229.
- Karnati, H.; Yalagala, R.; Undi, R.; Pasupuleti, S.; Gutti, R. (2014): Therapeutic potential of siRNA and DNazymes in cancer. In: *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (10), S. 9505–9521.
- Karsch-Völck, M.; Barrett, B.; Kiefer, D.; Bauer, R.; Ardjomand-Woelkart, K.; Linde, K. (2014): Echinacea for preventing and treating the common cold. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (2), CD000530.

- Kastelein, J.; Wedel, M.; Baker, B.; Su, J.; Bradley, J.; Yu, R. et al. (2006): Potent reduction of apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol by short-term administration of an antisense inhibitor of apolipoprotein B. In: *Circulation* 114 (16), S. 1729–1735.
- Katpally, U.; Fu, T.-M.; Freed, D.; Casimiro, D.; Smith, T. (2009): Antibodies to the buried N terminus of rhinovirus VP4 exhibit cross-serotypic neutralization. In: *Journal of virology* 83 (14), S. 7040–7048.
- Kay, A. (2005): The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. In: *Trends in molecular medicine* 11 (4), S. 148–152.
- Koczulla, A.; Vogelmeier, C.; Garn, H.; Renz, H. (2017): New concepts in asthma. Clinical phenotypes and pathophysiological mechanisms. In: *Drug discovery today* 22 (2), S. 388–396.
- Koziolekiewicz, M.; Gendaszewska, E.; Maszewska, M.; Stein, C.; Stec, W. (2001): The mononucleotide-dependent, nonantisense mechanism of action of phosphodiester and phosphorothioate oligonucleotides depends upon the activity of an ecto-5'-nucleotidase. In: *Blood* 98 (4), S. 995–1002.
- Krieg, A. (1999): Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides. In: *Biochimica et biophysica acta* 1489 (1), S. 107–116.
- Kruger, K.; Grabowski, P.; Zaug, A.; Sands, J.; Gottschling, D.; Cech, T. (1982): Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. In: *Cell* 31 (1), S. 147–157.
- Kurreck, J. (2003): Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. In: *Eur. J. Biochem.* 270 (8), S. 1628–1644.
- Kurreck, J.; Bieber, B.; Jahnel, R.; Erdmann, V. (2002): Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. In: *J. Biol. Chem.* 277 (9), S. 7099–7107.
- Kusov, Y.; Kanda, T.; Palmenberg, A.; Sgro, J.-Y.; Gauss-Müller, V. (2006): Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. In: *Journal of virology* 80 (11), S. 5599–5610.
- Kuwabara, T.; Warashina, M.; Tanabe, T.; Tani, K.; Asano, S.; Taira, K. (1997): Comparison of the specificities and catalytic activities of hammerhead ribozymes and DNA enzymes with respect to the cleavage of BCR-ABL chimeric L6 (b2a2) mRNA. In: *Nucleic Acids Res.* 25 (15), S. 3074–3081.
- Lambrecht, B.; Hammad, H. (2010): The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. In: *Lancet* 376 (9743), S. 835–843.
- Lau, S.; Yip, C.; Woo, P.; Yuen, K.-Y. (2010): Human rhinovirus C. A newly discovered human rhinovirus species. In: *Emerg Health Threats J* 3, e2.

- Lauring, A.; Andino, R. (2010): Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. In: *PLoS pathogens* 6 (7), e1001005.
- Lee, W.-M.; Lemanske, R.; Evans, M.; Vang, F.; Pappas, T.; Gangnon, R. et al. (2012): Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 186 (9), S. 886–891.
- Lee, Y.; Nomoto, A.; Detjen, B.; Wimmer, E. (1977): A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (1), S. 59–63.
- Lessler, J.; Reich, N.; Brookmeyer, R.; Perl, T.; Nelson, K.; Cummings, Derek A T (2009): Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. In: *Lancet Infect Dis* 9 (5), S. 291–300.
- Levin, A. (1999): A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. In: *Biochimica et biophysica acta* 1489 (1), S. 69–84.
- Lim, T.; Yuan, J.; Zhang, H.; Sall, A.; Liu, Z.; Su, Y.; Yang, D. (2008): Antisense DNA and RNA agents against picornaviruses. In: *Front. Biosci.* 13, S. 4707–4725.
- Lin, J.-Y.; Chen, T.-C.; Weng, K.-F.; Chang, S.-C.; Chen, L.-L.; Shih, S.-R. (2009): Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. In: *J. Biomed. Sci.* 16, S. 103.
- Linder, J.; Kraft, D.; Mohamed, Y.; Lu, Z.; Heil, L.; Tollefson, S. et al. (2013): Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (1), 69-77.e1-6.
- Lopez-Souza, N.; Dolganov, G.; Dubin, R.; Sachs, L.; Sassina, L.; Sporer, H. et al. (2004): Resistance of differentiated human airway epithelium to infection by rhinovirus. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 286 (2), L373-81.
- Mallia, P.; Message, S.; Gielen, V.; Contoli, M.; Gray, K.; Keadze, T. et al. (2011): Experimental rhinovirus infection as a human model of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 183 (6), S. 734–742.
- Maneechotesuwan, K.; Xin, Y.; Ito, K.; Jazrawi, E.; Lee, K.-Y.; Usmani, O. et al. (2007): Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (4), S. 2491–2498.
- Manolitsas, N.; Trigg, C.; McAulay, A.; Wang, J.; Jordan, S.; D'Ardenne, A.; Davies, R. (1994): The expression of intercellular adhesion molecule-1 and the  $\beta$ 1-integrins in asthma. In: *Eur Respir J* 7 (8), S. 1439–1444.

- Martin, J.; Panariti, A. (2017): Fenotipos del asma, ¿son importantes? Do they matter? In: *Archivos de bronconeumologia* 53 (4), S. 177–179.
- Martinez, F. (2007): Gene-environment interactions in asthma. With apologies to William of Ockham. In: *Proceedings of the American Thoracic Society* 4 (1), S. 26–31.
- Martinez, F.; Vercelli, D. (2013): Asthma. In: *Lancet* 382 (9901), S. 1360–1372.
- Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Lührmann, R.; Tuschl, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. In: *Cell* 110 (5), S. 563–574.
- Masoli, M.; Fabian, D.; Holt, S.; Beasley, R. (2004): The global burden of asthma. Executive summary of the GINA Dissemination Committee report. In: *Allergy* 59 (5), S. 469–478.
- McIntyre, C.; Knowles, N.; Simmonds, P. (2013): Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. In: *J. Gen. Virol.* 94 (Pt 8), S. 1791–1806.
- Message, S.; Laza-Stanca, V.; Mallia, P.; Parker, H.; Zhu, J.; Kebabze, T. et al. (2008): Rhinovirus-induced lower respiratory illness is increased in asthma and related to virus load and Th1/2 cytokine and IL-10 production. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36), S. 13562–13567.
- Moffatt, M.; Gut, I.; Demenais, F.; Strachan, D.; Bouzigon, E.; Heath, S. et al. (2010): A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. In: *The New England journal of medicine* 363 (13), S. 1211–1221.
- Monto, A. (2002): The seasonality of rhinovirus infections and its implications for clinical recognition. In: *Clinical Therapeutics* 24 (12), S. 1987–1997.
- Monto, A.; Ullman, B. (1974): Acute respiratory illness in an American community. The Tecumseh study. In: *JAMA* 227 (2), S. 164–169.
- Moussion, C.; Ortega, N.; Girard, J.-P. (2008): The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo. A novel 'alarmin'? In: *PloS one* 3 (10), e3331.
- Murphy, E. (2000): Mysteries of magnesium homeostasis. In: *Circ. Res.* 86 (3), S. 245–248.
- Murray, C.; Poletti, G.; Kebabze, T.; Morris, J.; Woodcock, A.; Johnston, S.; Custovic, A. (2006): Study of modifiable risk factors for asthma exacerbations: virus infection and allergen exposure increase the risk of asthma hospital admissions in children. In: *Thorax* 61 (5), S. 376–382.
- Musher, D. (2003): How contagious are common respiratory tract infections? In: *The New England journal of medicine* 348 (13), S. 1256–1266.

- Newcomb, D.; Peebles, R. (2013): Th17-mediated inflammation in asthma. In: *Current opinion in immunology* 25 (6), S. 755–760.
- Nicholson, K.; Kent, J.; Ireland, D. (1993): Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 307 (6910), S. 982–986.
- Normansell, R.; Walker, S.; Milan, S.; Walters, E.; Nair, P. (2014): Omalizumab for asthma in adults and children. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (1), CD003559.
- Olenec, J.; Kim, W.; Lee, W.-M.; Vang, F.; Pappas, T.; Salazar, L. et al. (2010): Weekly monitoring of children with asthma for infections and illness during common cold seasons. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (5), 1001-1006.e1.
- Olson, N.; Kolatkar, P.; Oliveira, M.; Cheng, R.; Greve, J.; McClelland, A. et al. (1993): Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (2), S. 507–511.
- Oommen, A.; Lambert, P.; Grigg, J. (2003): Efficacy of a short course of parent-initiated oral prednisolone for viral wheeze in children aged 1–5 years. Randomised controlled trial. In: *The Lancet* 362 (9394), S. 1433–1438.
- Palmenberg, A.; Gern, J. (2015): Classification and evolution of human rhinoviruses. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1221, S. 1–10.
- Palmenberg, A.; Rathe, J.; Liggett, S. (2010): Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (6), 1190-9; quiz 1200-1.
- Palmenberg, A.; Spiro, D.; Kuzmickas, R.; Wang, S.; Djikeng, A.; Rathe, J. et al. (2009): Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5923), S. 55–59.
- Papadopoulos, N.; Bates, P.; Bardin, P.; Papi, A.; Leir, S.; Fraenkel, D. et al. (2000): Rhinoviruses infect the lower airways. In: *The Journal of infectious diseases* 181 (6), S. 1875–1884.
- Papi, A.; Contoli, M. (2011): Rhinovirus vaccination. The case against. In: *The European respiratory journal* 37 (1), S. 5–7.
- Patick, A. (2006): Rhinovirus chemotherapy. In: *Antiviral Res.* 71 (2-3), S. 391–396.
- Patick, A.; Brothers, M.; Maldonado, F.; Binford, S.; Maldonado, O.; Fuhrman, S. et al. (2005): In vitro antiviral activity and single-dose pharmacokinetics in humans of a novel, orally bioavailable inhibitor of human rhinovirus 3C protease. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49 (6), S. 2267–2275.
- Paul, A.; van Boom, J.; Filippov, D.; Wimmer, E. (1998): Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. In: *Nature* 393 (6682), S. 280–284.



- Paul, A.; Wimmer, E. (2015): Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. In: *Virus research* 206, S. 12–26.
- Pavord, I.; Korn, S.; Howarth, P.; Bleecker, E.; Buhl, R.; Keene, O. et al. (2012): Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM). A multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. In: *Lancet* 380 (9842), S. 651–659.
- Pearce, N.; Aït-Khaled, N.; Beasley, R.; Mallol, J.; Keil, U.; Mitchell, E.; Robertson, C. (2007): Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). In: *Thorax* 62 (9), S. 758–766.
- Peltola, V.; Waris, M.; Osterback, R.; Susi, P.; Ruuskanen, O.; Hyypiä, T. (2008): Rhinovirus transmission within families with children. Incidence of symptomatic and asymptomatic infections. In: *The Journal of infectious diseases* 197 (3), S. 382–389.
- Peracchi, A. (2005): DNA catalysis: potential, limitations, open questions. In: *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 6 (8), S. 1316–1322.
- Piper, S.; Ferguson, J.; Kay, L.; Parker, L.; Sabroe, I.; Sleeman, M. et al. (2013): The role of interleukin-1 and interleukin-18 in pro-inflammatory and anti-viral responses to rhinovirus in primary bronchial epithelial cells. In: *PloS one* 8 (5), e63365.
- Potaczek, D.; Garn, H.; Unger, S.; Renz, H. (2016): Antisense molecules. A new class of drugs. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 137 (5), S. 1334–1346.
- Prchla, E.; Kuechler, E.; Blaas, D.; Fuchs, R. (1994): Uncoating of human rhinovirus serotype 2 from late endosomes. In: *Journal of virology* 68 (6), S. 3713–3723.
- Price, D.; Musgrave, S.; Shepstone, L.; Hillyer, E.; Sims, E.; Gilbert, R. et al. (2011): Leukotriene antagonists as first-line or add-on asthma-controller therapy. In: *The New England journal of medicine* 364 (18), S. 1695–1707.
- Rackemann, F. (1947): Intrinsic Asthma. In: *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 23 (5), S. 302–306.
- Ramasamy, A.; Kuokkanen, M.; Vedantam, S.; Gajdos, Z.; Couto Alves, A.; Lyon, H. et al. (2012): Genome-wide association studies of asthma in population-based cohorts confirm known and suggested loci and identify an additional association near HLA. In: *PloS one* 7 (9), e44008.
- Ray, A.; Oriss, T.; Wenzel, S. (2015): Emerging molecular phenotypes of asthma. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 308 (2), L130–40.
- Reddel, H.; Barnes, D. (2006): Pharmacological strategies for self-management of asthma exacerbations. In: *The European respiratory journal* 28 (1), S. 182–199.

- Renwick, N.; Schweiger, B.; Kapoor, V.; Liu, Z.; Villari, J.; Bullmann, R. et al. (2007): A recently identified rhinovirus genotype is associated with severe respiratory-tract infection in children in Germany. In: *The Journal of infectious diseases* 196 (12), S. 1754–1760.
- Reponen, T.; Vesper, S.; Levin, L.; Johansson, E.; Ryan, P.; Burkle, J. et al. (2011): High environmental relative moldiness index during infancy as a predictor of asthma at 7 years of age. In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 107 (2), S. 120–126.
- Riedler, J.; Braun-Fahrlander, C.; Eder, W.; Schreuer, M.; Waser, M.; Maisch, S. et al. (2001): Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. In: *Lancet* 358 (9288), S. 1129–1133.
- Robinson, D.; Hamid, Q.; Ying, S.; Tsicopoulos, A.; Barkans, J.; Bentley, A. et al. (1992): Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. In: *N. Engl. J. Med.* 326 (5), S. 298–304.
- Rodrigo, G.; Castro-Rodríguez, J. (2015): What is the role of tiotropium in asthma? A systematic review with meta-analysis. In: *Chest* 147 (2), S. 388–396.
- Roduit, C.; Frei, R.; Depner, M.; Schaub, B.; Loss, G.; Genuneit, J. et al. (2014): Increased food diversity in the first year of life is inversely associated with allergic diseases. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 133 (4), S. 1056–1064.
- Rohde, G. (2011): Rhinovirus vaccination: the case in favour. In: *The European respiratory journal* 37 (1), S. 3–4.
- Rollinger, J.; Schmidtke, M. (2011): The human rhinovirus. Human-pathological impact, mechanisms of antirhinoviral agents, and strategies for their discovery. In: *Medicinal research reviews* 31 (1), S. 42–92.
- Rossmann, M.; Arnold, E.; Erickson, J.; Frankenberger, E.; Griffith, J.; Hecht, H.-J. et al. (1985): Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. In: *Nature* 317 (6033), S. 145–153.
- Santoro, S.; Joyce, G. (1997): A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (9), S. 4262–4266.
- Santoro, S.; Joyce, G. (1998): Mechanism and utility of an RNA-cleaving DNA enzyme. In: *Biochemistry* 37 (38), S. 13330–13342.
- Savolainen, C.; Mulders, M.; Hovi, T. (2002): Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. In: *Virus research* 85 (1), S. 41–46.
- Schaub, B.; Liu, J.; Höppler, S.; Schleich, I.; Huehn, J.; Olek, S. et al. (2009): Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 123 (4), 774-82.e5.

- Schmitt, E.; van Brandwijk, R.; Fischer, H.; Rüde, E. (1990): Establishment of different T cell sublines using either interleukin 2 or interleukin 4 as growth factors. In: *European journal of immunology* 20 (8), S. 1709–1715.
- Schubert, S.; Fürste, J.; Werk, D.; Grunert, H.-P.; Zeichhardt, H.; Erdmann, V.; Kurreck, J. (2004): Gaining target access for deoxyribozymes. In: *J. Mol. Biol.* 339 (2), S. 355–363.
- Schubert, S.; Gül, D.; Grunert, H.-P.; Zeichhardt, H.; Erdmann, V.; Kurreck, J. (2003): RNA cleaving '10-23' DNAzymes with enhanced stability and activity. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (20), S. 5982–5992.
- Schubert, S.; Kurreck, J. (2004): Ribozyme- and deoxyribozyme-strategies for medical applications. In: *CDT* 5 (8), S. 667–681.
- Seipelt, J.; Liebig, H.-D.; Sommergruber, W.; Gerner, C.; Kuechler, E. (2000): 2A Proteinase of Human Rhinovirus Cleaves Cytokeratin 8 in Infected HeLa Cells. In: *J. Biol. Chem.* 275 (26), S. 20084–20089.
- Sel, S.; Wegmann, M.; Dicke, T.; Sel, S.; Henke, W.; Yildirim, A. et al. (2008): Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNAzyme. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (4), 910-916.e5.
- Senior, K. (2002): FDA panel rejects common cold treatment. In: *The Lancet Infectious Diseases* 2 (5), S. 264.
- Shaw, D.; Rustagi, P.; Kandimalla, E.; Manning, A.; Jiang, Z.; Agrawal, S. (1997): Effects of synthetic oligonucleotides on human complement and coagulation. In: *Biochemical Pharmacology* 53 (8), S. 1123–1132.
- Shi, H.; Xiao, C.; Zhong, D.; Qin, S.; Liu, Y.; Liang, G. et al. (1998): Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 157 (1), S. 204–209.
- Silverman, S. (2005): In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. In: *Nucleic Acids Res.* 33 (19), S. 6151–6163.
- Singh, M.; Das, R. (2013): Zinc for the common cold. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (6), CD001364.
- Sioud, M. (1997): Effects of variations in length of hammerhead ribozyme antisense arms upon the cleavage of longer RNA substrates. In: *Nucleic Acids Res.* 25 (2), S. 333–338.
- Sly, P.; Kusel, M.; Holt, P. (2010): Do early-life viral infections cause asthma? In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (6), S. 1202–1205.
- Sohail, M.; Southern, E. (2000): Selecting optimal antisense reagents. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 44 (1), S. 23–34.

- Sommergruber, W.; Ahorn, H.; Klump, H.; Seipelt, J.; Zoephel, A.; Fessler, F. et al. (1994): 2A proteinases of coxsackie- and rhinovirus cleave peptides derived from eIF-4 gamma via a common recognition motif. In: *Virology* 198 (2), S. 741–745.
- Steil, B.; Barton, D. (2009): Cis-active RNA elements (CREs) and picornavirus RNA replication. In: *Virus research* 139 (2), S. 240–252.
- Stein, C.; Colombini, M. (2008): Specific VDAC inhibitors. Phosphorothioate oligonucleotides. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40 (3), S. 157–162.
- Stone, J.; Rijnbrand, R.; Stein, D.; Ma, Y.; Yang, Y.; Iversen, P.; Andino, R. (2008): A morpholino oligomer targeting highly conserved internal ribosome entry site sequence is able to inhibit multiple species of picornavirus. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (6), S. 1970–1981.
- Strachan, D. (1989): Hay fever, hygiene, and household size. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 299 (6710), S. 1259–1260.
- Sun, L.; Cairns, M.; Gerlach, W.; Witherington, C.; Wang, L.; King, A. (1999): Suppression of smooth muscle cell proliferation by a c-myc RNA-cleaving deoxyribozyme. In: *J. Biol. Chem.* 274 (24), S. 17236–17241.
- Tan, W. (2005): Viruses in asthma exacerbations. In: *Curr Opin Pulm Med* 11 (1), S. 21–26.
- Taylor, D.; Bateman, E.; Boulet, L.-P.; Boushey, H.; Busse, W.; Casale, T. et al. (2008): A new perspective on concepts of asthma severity and control. In: *The European respiratory journal* 32 (3), S. 545–554.
- To, T.; Stanojevic, S.; Moores, G.; Gershon, A.; Bateman, E.; Cruz, A.; Boulet, L.-P. (2012): Global asthma prevalence in adults. Findings from the cross-sectional world health survey. In: *BMC public health* 12, S. 204.
- Turner, R.; Fuls, J.; Rodgers, N.; Goldfarb, H.; Lockhart, L.; Aust, L. (2012): A randomized trial of the efficacy of hand disinfection for prevention of rhinovirus infection. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 (10), S. 1422–1426.
- Turner, R.; Hendley, J. (2005): Virucidal hand treatments for prevention of rhinovirus infection. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56 (5), S. 805–807.
- Turner, R.; Wecker, M.; Pohl, G.; Witek, T.; McNally, E.; St George, R. et al. (1999): Efficacy of tremacamra, a soluble intercellular adhesion molecule 1, for experimental rhinovirus infection. A randomized clinical trial. In: *JAMA* 281 (19), S. 1797–1804.
- Turowska, A.; Librizzi, D.; Baumgartl, N.; Kuhlmann, J.; Dicke, T.; Merkel, O. et al. (2013): Biodistribution of the GATA-3-specific DNzyme hgd40 after inhalative

- exposure in mice, rats and dogs. In: *Toxicology and applied pharmacology* 272 (2), S. 365–372.
- Uller, L.; Leino, M.; Bedke, N.; Sammut, D.; Green, B.; Lau, L. et al. (2010): Double-stranded RNA induces disproportionate expression of thymic stromal lymphopoietin versus interferon-beta in bronchial epithelial cells from donors with asthma. In: *Thorax* 65 (7), S. 626–632.
- Vaerman, J.; Moureau, P.; Deldime, F.; Lewalle, P.; Lammineur, C.; Morschhauser, F.; Martiat, P. (1997): Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. In: *Blood* 90 (1), S. 331–339.
- van der Linden, L.; Wolthers, K.; van Kuppeveld, F. (2015): Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. In: *Viruses* 7 (8), S. 4529–4562.
- Verdaguer, N.; Blaas, D.; Fita, I. (2000): Structure of human rhinovirus serotype 2 (HRV2). In: *Journal of molecular biology* 300 (5), S. 1179–1194.
- Victor, J.; Steger, G.; Riesner, D. (2017): Inability of DNAzymes to cleave RNA in vivo is due to limited MgFormula. See text concentration in cells. In: *European biophysics journal: EBJ*.
- Wahlestedt, C.; Salmi, P.; Good, L.; Kela, J.; Johnsson, T.; Hökfelt, T. et al. (2000): Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (10), S. 5633–5638.
- Waman, V.; Kolekar, P.; Kale, M.; Kulkarni-Kale, U. (2014): Population structure and evolution of Rhinoviruses. In: *PLoS ONE* 9 (2).
- Wark, P.; Gibson, P. (2006): Asthma exacerbations. 3. Pathogenesis. In: *Thorax* 61 (10), S. 909–915.
- Wark, P.; Johnston, S.; Bucchieri, F.; Powell, R.; Puddicombe, S.; Laza-Stanca, V. et al. (2005): Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. In: *J. Exp. Med.* 201 (6), S. 937–947.
- Watters, K.; Palmenberg, A. (2011): Differential processing of nuclear pore complex proteins by rhinovirus 2A proteases from different species and serotypes. In: *Journal of virology* 85 (20), S. 10874–10883.
- Wenzel, S. (2012): Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. In: *Nat. Med.* 18 (5), S. 716–725.
- Winkler, J.; Stessl, M.; Amartei, J.; Noe, C. (2010): Off-target effects related to the phosphorothioate modification of nucleic acids. In: *ChemMedChem* 5 (8), S. 1344–1352.
- Witwer, C.; Rauscher, S.; Hofacker, I.; Stadler, P. (2001): Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. In: *Nucleic Acids Res.* 29 (24), S. 5079–5089.

- Yasuda, K.; Rutz, M.; Schlatter, B.; Metzger, J.; Lippa, P.; Schmitz, F. et al. (2006): CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. In: *European journal of immunology* 36 (2), S. 431–436.
- Yen, L.; Strittmatter, S.; Kalb, R. (1999): Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. In: *Ann Neurol.* 46 (3), S. 366–373.
- Zambrano, J.; Carper, H.; Rakes, G.; Patrie, J.; Murphy, D.; Platts-Mills, Thomas A E et al. (2003): Experimental rhinovirus challenges in adults with mild asthma: response to infection in relation to IgE. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (5), S. 1008–1016.
- Zamore, P.; Tuschl, T.; Sharp, P.; Bartel, D. (2000): RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. In: *Cell* 101 (1), S. 25–33.
- Ziegler, E.; Borman, A.; Deliat, F.; Liebig, H.; Jugovic, D.; Kean, K. et al. (1995): Picornavirus 2A proteinase-mediated stimulation of internal initiation of translation is dependent on enzymatic activity and the cleavage products of cellular proteins. In: *Virology* 213 (2), S. 549–557.
- Zöllner, I.; Weiland, S.; Piechotowski, I.; Gabrio, T.; Mutius, E. von; Link, B. et al. (2005): No increase in the prevalence of asthma, allergies, and atopic sensitisation among children in Germany: 1992-2001. In: *Thorax* 60 (7), S. 545–548.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bsp.	Beispiel
Bspw.	Beispielsweise
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD4+ T-Zellen	Cluster of differentiation 4 positive T-Zellen
CD40	Cluster of differentiation 40
CDHR3	Cadherin related family member 3
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin (Basensequenz)
CRE	Cis-agierendes Replikationselement
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAzym	Desoxyribozym
dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fc <sub>ε</sub> -II-Rezeptor	Niedrig-affiner Immunglobulin E Rezeptor
Fc <sub>ε</sub> -I-Rezeptor	Hoch-affiner Immunglobulin E Rezeptor
G	Guanin
Ggf.	Gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRV-A	Rhinovirus Spezies A
HRV-B	Rhinovirus Spezies B
HRV-C	Rhinovirus Spezies C
HRVs	Humane Rhinoviren
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICS	Inhalative Kortikosteroide
IgE	Immunglobulin E

IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
LDL-R	Low Density Lipoprotein-Rezeptor
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MHCII	Hapthistokompatibilitätskomplex 2
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	Nukleinbase (beliebig)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF-κB	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ORF	Offener Leserahmen
Pb <sup>2+</sup>	Blei-Ion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	Purin
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RNase H	Ribonuklease H
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SNPs	Einzelnukeotid-Polymorphismen
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Th1-Zelle	T1-Helferzelle
Th2-Zelle	T2-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic stromal lymphopoetin
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VP1-4	Virale Kapsidproteine 1-4
VPg	Genom-gebundenes virales Protein
Y	Pyrimidin



## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Rhinovirus-Stammbaum aller bekannten Typen anhand der VP1-RNA Genomsequenz .....	10
Abb. 2	Schematischer Aufbau des HRV-Genoms .....	11
Abb. 3	Antisense Mechanismen im Vergleich. ....	14
Abb. 4	Schematische Struktur eines 10-23 DNAzyms während der Bindung über Watson-Crick-Basenpaarung an eine Ziel-RNA. ....	17
Abb. 5	Funktionsweise eines DNAzyms:.....	17
Abb. 6	Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> -Selektion. ....	19
Abb. 7	Beispiel für eine Spaltungsprüfung: .....	44
Abb. 8	Screening HRV-1B 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du1B-34 bis Dua-02) .. .....	48
Abb. 9	Screening HRV-1B 5'UTR (Testung der DNAzyme Dua-01 bis Du1B-05) ... .....	48
Abb. 10	Screening HRV-1B 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du1B-04 bis Du1B-01) .....	49
Abb. 11	Screening HRV-1B CRE Region (Testung der DNAzyme Dc1B-34 bis Dc1B- 20).....	49
Abb. 12	Screening HRV-1B CRE Region (Testung der DNAzyme Dc1B-19 bis Dc1B- 05).....	50
Abb. 13	Screening HRV-1B CRE Region (Testung der DNAzyme Dc1B-04 bis Dc1B- 01).....	50
Abb. 14	Screening HRV-16 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du16-32 bis Du16-23). .....	51
Abb. 15	Screening HRV-16 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du16-22 bis Du16-08). .....	51
Abb. 16	Screening HRV-16 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du16-07 bis Du16-01); Screening HRV-16 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc16-41 bis Dc16- 37).....	52
Abb. 17	Screening HRV-16 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc16-36 bis Dc16- 22).....	53
Abb. 18	Screening HRV-16 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc16-21 bis Dc16- 07).....	53
Abb. 19	Screening HRV-16 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc16-06 bis Dc16- 01); Screening HRV-29 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du29-33 bis Dua- 04).....	54

Abb. 20	Screening HRV-29 5'-UTR (Testung der DNAzyme Dua-03 bis Du29-11) ...	55
Abb. 21	Screening HRV-29 5'-UTR (Testung der DNAzyme Du16/29-01 bis Du29-01).....	55
Abb. 22	Screening HRV-29 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc29-32 bis Dc29-20).....	56
Abb. 23	Screening HRV-29 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc29-19 bis Dc29-07).....	56
Abb. 24	Screening HRV-29 CRE Region (Testung der DNAzyme Dc29-06 bis Dc29-01).....	57
Abb. 25	Schematische Darstellung für die Testung der Kreuz-Aktivität am Beispiel von Schnittstelle 20 in der CRE Region.....	62
Abb. 26	Testung auf Kreuz-Aktivität in der CRE Region (Testung der DNAzyme Dc1B-31, Dc16-32 und Dc29-28 an Schnittstelle 20; Testung der DNAzyme Dc1B-06 und Dc29-03 an Schnittstelle 4).....	63
Abb. 27	Testung auf Kreuz-Aktivität in der CRE Region (Testung der DNAzyme Dc1B-38 und Dc16-38 an Schnittstelle 25; Testung der DNAzyme Dc1B-33, Dc16-34 und Dc29-30 an Schnittstelle 22) .....	63
Abb. 28	Testung auf Kreuz-Aktivität in der 5'-UTR und Screening von DNAzymen Du1B-AU und Du16/29-AU (Testung der DNAzyme Du1B-25, Du16-33 und Du29-30 an Schnittstelle 8; Testung von Du1B-AU und Du16/29-AU) .....	64
Abb. 29	Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von HRV-2 in der 5'-UTR mit den markierten Schnittstellen der schneidenden DNAzyme.....	66
Abb. 30	Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-01 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität .....	67
Abb. 31	Testung von Längenvarianten des DNAzyms Dua-01 .....	67
Abb. 32	Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-02 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität .....	68
Abb. 33	Testung von Längenvarianten des DNAzyms Dua-02 .....	69
Abb. 34	Veränderungen in der Länge der Bindungsdomänen von Dua-03 und die Effekte auf Virustyp-Abdeckung und Aktivität .....	70
Abb. 35	Testung von Längenvarianten des DNAzyms Dua-03 .....	70
Abb. 36	Testung der Effekte von Loopbreaker <sup>23</sup> auf die DNAzym-Aktivität .....	72
Abb. 37	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-1B 5'-UTR .....	73
Abb. 38	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-16 5'-UTR .....	74

Abb. 39	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-01 in der HRV-29 5'-UTR .....	74
Abb. 40	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-1B 5'-UTR.....	76
Abb. 41	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-16 5'-UTR .....	76
Abb. 42	Qualitative Testung möglicher Längenvarianten von Dua-02 und Dua-03 in der HRV-29 5'-UTR .....	77
Abb. 43	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von DNazym Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	79
Abb. 44	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von DNazym Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	79
Abb. 45	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von DNazym Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	80
Abb. 46	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne des DNazyms Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	81
Abb. 47	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne des DNazyms Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	82
Abb. 48	Quantitative Spaltungsaktivität von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne des DNazyms Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	82
Abb. 49	Ausmaß der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 gegenüber dem HRV-1B 5'-UTR Fragment in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	84
Abb. 50	Testung der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.....	85
Abb. 51	Ausmaß der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 gegenüber des HRV-1B 5'-UTR Fragments in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur .....	85
Abb. 52	Testung von Dua-02-L10R11 mit Modifikation .....	86
Abb. 53	Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	140
Abb. 54	Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	140
Abb. 55	Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	141
Abb. 56	Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	141
Abb. 57	Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	142

---

Abb. 58	Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3 .....	142
Abb. 59	Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	143
Abb. 60	Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	143
Abb. 61	Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	144
Abb. 62	Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	144
Abb. 63	Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	145
Abb. 64	Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4 .....	145
Abb. 65	Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	146
Abb. 66	Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	146
Abb. 67	Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	147
Abb. 68	Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	147
Abb. 69	Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	148
Abb. 70	Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5 .....	148
Abb. 71	Testung 1 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	149
Abb. 72	Testung 2 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	149
Abb. 73	Testung 3 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit .....	150

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1	Chemikalien und Reagenzien .....	20
Tab. 2	Marker und Ladepuffer .....	20
Tab. 3	Kits .....	21
Tab. 4	Restriktionsenzyme und Puffer .....	21
Tab. 5	Vektor Systeme .....	21
Tab. 6	Verbrauchsmaterialien.....	21
Tab. 7	Geräte .....	22
Tab. 8	Software .....	22
Tab. 9	DNAzyme.....	23
Tab. 10	Andere Oligonukleotide .....	30
Tab. 11	HRV-1B 5'-UTR RNA Fragment .....	31
Tab. 12	HRV-16 5'-UTR RNA Fragment.....	31
Tab. 13	HRV-29 5'-UTR RNA Fragment.....	31
Tab. 14	HRV-1B CRE RNA Fragment .....	32
Tab. 15	HRV-16 CRE RNA Fragment.....	32
Tab. 16	HRV-29 CRE RNA Fragment.....	32
Tab. 17	Auflistung der berücksichtigten Virustypen.....	34
Tab. 18	Analyse der schneidenden DNAzyme in der 5'-UTR .....	58
Tab. 19	Analyse der schneidenden DNAzyme in der CRE Region .....	59
Tab. 20	Kreuz-Aktivität von DNAzymen in der CRE Region.....	64
Tab. 21	Kreuz-Aktivität von DNAzymen in der 5'-UTR.....	65
Tab. 22	Auflistung der Virustypisolate mit Angaben zur Abdeckung durch die aktiven DNAzyme in der 5'-UTR aus der Screening-Untersuchung.....	129
Tab. 23	Auflistung der Virustypisolate mit Zielsequenzen für die aktiven DNAzyme in der CRE Region (aus der Screening-Untersuchung).....	138

## 11 PUBLIKATIONEN

Potaczek, D.\*; Garn, H.\*; **Unger, S.**; Renz, H. (2016): Antisense molecules. A new class of drugs. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (5), S. 1334–1346.

Potaczek D.\*; **Unger S.\***; Zhang N.; Taka S.; Michel S.; Akdağ N.; Lan F.; Helfer M.; Hudemann C.; Eickmann M.; Skevaki C.; Megremis S.; Sadewasser A.; Alashkar Alhamwe B.; Alhamdan F.; Akdis M.; Edwards M.; Johnston S.; Akdis C.; Becker S.; Bachert C.; Papadopoulos N.; Garn H.\*; Renz H.\* (2018): Development and characterization of DNAzyme candidates demonstrating significant efficiency against human rhinoviruses. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Potaczek D.\*; **Unger S.\***; Zhang N.; Taka S.; Michel S.; Akdağ N.; Lan F.; Helfer M.; Hudemann C.; Eickmann M.; Skevaki C.; Megremis S.; Sadewasser A.; Alashkar Alhamwe B.; Alhamdan F.; Akdis M.; Edwards M.; Johnston S.; Akdis C.; Becker S.; Bachert C.; Papadopoulos N.; Garn H.\*; Renz H.\* (2018): Development and characterization of effective DNAzymes against human rhinoviruses. In: *Allergy* 73 (S105), S. 370. Abstract No. 0630. EAACI Congress 2018, Munich, Germany; POSTER PRIZE.

\*gleichwertiger Beitrag

## 12 ANHANG

### 12.1 Ergebnisanhang

#### 12.1.1 Detaillierte Ergebnisse der *in silico* Analyse

Die folgenden Tabellen enthalten die detaillierten Ergebnisse der *in silico* Analyse.

**Tab. 22** Auflistung der Virustypisolate mit Angaben zur Abdeckung durch die aktiven DNAzyme in der 5'-UTR aus der Screening-Untersuchung

Virustyp (HRV-)_ Genbank Zugangsnummer	Du1B-12 Du16-15 Du29-14	Du16/29-02	Dua-01	Dua-02	Dua-03	Dua-04	Du1B-24 Du16-32 Du29-29	Du1B-25 Du16-33 Du29-30	Du1B-28	Du16-37
A1_D00239.1	J (1B-12)	N	J	J	J	J	N	J (1B-25)	J	N
A1_FJ445111.1	J (1B-12)	N	J	J	J	J	N	N	J	N
A1_JN815255.1	N	N	J	J	J	J	N	J (16-33)	J	N
A1_JN837694.1	N	N	J	J	J	J	N	N	J	N
A2_X02316.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	J (29-30)	N	N
A7_DQ473503.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A7_FJ445176.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A8_FJ445113.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A8_FJ445170.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A9_FJ445177.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A9_FJ445114.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	N	J (29-30)	N	N
A9_FJ445115.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A10_DQ473498.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A10_FJ445178.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A10_JN798575.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A10_JN798582.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A10_JN541269.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A10_JN815247.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A11_EF173414.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A12_EF173415.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A12_HQ123441.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
A12_JF781511.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
A13_FJ445116.1	N	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A13_FJ445117.1	N	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A15_DQ473493.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A15_JN541268.1	N	J	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N

<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
A16_L24917.1	J (16-15)	J	J	N	N	N	J (16-32)	J (16-33)	N	J
A16_JN562722.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A16_JN614992.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	J (16-33)	N	J
A16_JN798564.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	J (16-33)	N	J
A16_JN798574.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	J (16-33)	N	J
A16_JN815253.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	J (16-33)	N	J
A16_JN990704.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	J
A16_JX074057.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N
A18_FJ445118.1	J (29-14)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A18_JF781496.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A18_JF781508.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A19_FJ445119.1	J (1B-12)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A19_JQ747746.1	J (1B-12)	N	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A19_JQ747750.1	J (1B-12)	N	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A20_FJ445120.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A20_JN541270.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A20_JN614993.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A20_JN798571.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A20_JQ994494.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A21_FJ445121.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A21_JN837693.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A21_JQ747747.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A22_FJ445122.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A23_DQ473497.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A23_JN621244.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A23_JN815254.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A23_JN837696.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A24_EF173416.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A24_FJ445190.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A24_JN798563.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A25_FJ445123.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A28_DQ473508.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A28_JN798577.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A28_JN798580.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A28_JQ747751.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A29_DQ473499.1	N	J	J	J	J	J	J (29-29)	N	N	N



<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
A29_FJ445125.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (29-29)	J (29-30)	N	N
A30_DQ473512.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	N	J (29-30)	N	N
A30_FJ445179.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	N	J (29-30)	N	N
A30_JN798557.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A31_FJ445126.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	J (16-33)	N	N
A32_FJ445127.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A33_FJ445128.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	J (16-33)	N	N
A33_JN815250.1	?	?	J	J	N	N	N	N	N	N
A33_JN990707.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A34_DQ473501.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A34_FJ445189.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A34_JF781510.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A34_JF781512.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A34_JN562720.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A36_DQ473505.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JF781497.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN614994.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN621243.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN798583.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN798584.1	N	J	J	J	N	N	N	J (1B-25)	N	N
A36_JN815241.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN815242.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN815246.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JN837697.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A36_JX074050.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A38_DQ473495.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A38_FJ445180.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A38_JQ994496.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A39_AY751783.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A40_FJ445129.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A40_JN798579.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A40_JQ245967.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A40_JX074051.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A41_DQ473491.1	N	N	J	J	J	J	N	J (29-30)	N	N
A43_FJ445131.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A43_JN815237.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A45_FJ445132.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A46_DQ473506.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N

<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
A47_FJ445133.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A47_GQ223229.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A47_JN837692.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A49_DQ473496.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A49_FJ445134.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A49_JN621241.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A49_JN798561.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A49_JN798589.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A50_FJ445135.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A51_FJ445136.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A51_JN562725.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A53_DQ473507.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A53_JN798587.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A54_FJ445138.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A54_FJ445139.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A54_FJ445173.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A55_DQ473511.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A55_JQ837718.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A56_FJ445140.1	N	J	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A56_EU840727.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A57_FJ445141.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	J	N
A58_FJ445142.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A58_JX025558.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A59_DQ473500.1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A59_JN541266.1	J (29-14)	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A60_FJ445143.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A60_JN798590.1	N	J	N	N	N	N	N	N	N	N
A61_FJ445144.1	N	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A61_JN798560.1	N	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A62_FJ445145.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A63_FJ445146.1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
A64_EF173417.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A64_FJ445181.1	J (16-15)	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A65_FJ445147.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A65_JF781504.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A65_JQ245966.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A66_FJ445148.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A66_JN112340.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N

Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer	Du1B-12 Du16-15 Du29-14	Du16/29-02	Dua-01	Dua-02	Dua-03	Dua-04	Du1B-24 Du16-32 Du29-29	Du1B-25 Du16-33 Du29-30	Du1B-28	Du16-37
A66_JN621246.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A66_JQ837715.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A67_FJ445149.1	J (1B-12)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A67_JN621245.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A68_FJ445150.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	J (29-30)	N	N
A68_JN798578.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A71_FJ445152.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A73_DQ473492.1	N	N	J	J	J	J	N	J (16-33)	N	N
A74_DQ473494.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A75_DQ473510.1	N	N	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A75_JF781503.1	N	N	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A75_JN837690.1	N	N	J	J	N	N	J (29-29)	N	N	N
A76_DQ473502.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A76_FJ445182.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A76_JN815238.1	J (29-14)	J	?	?	?	?	N	N	N	N
A76_JX074049.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A76_JX074055.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A77_FJ445154.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A78_EF173418.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A78_FJ445183.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A80_FJ445156.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A80_JN798586.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A80_JN798576.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A80_JN990705.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A81_FJ445157.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	J (16-32)	N	N	N
A81_FJ445158.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A81_FJ445159.1	J (16-15)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A81_HQ123442.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
A82_DQ473509.1	N	N	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A82_FJ445160.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A82_JN798556.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A82_JN798585.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A82_JQ837722.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A88_DQ473504.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A89_M16248.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A89_FJ445165.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A89_FJ445166.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A89_FJ445184.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N

Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer	Du1B-12 Du16-15 Du29-14	Du16/29-02	Dua-01	Dua-02	Dua-03	Dua-04	Du1B-24 Du16-32 Du29-29	Du1B-25 Du16-33 Du29-30	Du1B-28	Du16-37
A89_JQ837716.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A89_JQ837719.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A90_FJ445167.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
A94_EF173419.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A94_FJ445185.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A96_FJ445171.1	N	N	J	J	J	J	N	N	N	N
A100_FJ445175.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A101_GQ415051.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A101_GQ415052.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A101_JQ245965.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A102_EF155421.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A103_JF965515.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A103_JQ747749.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A103_JQ994499.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A104_JN562727.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
A104_JX074047.1	J (29-14)	J	J	?	?	?	?	?	?	N
A104_JX193797.1	J (29-14)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	?	?
A105_JN614995.1	N	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A105_JN990699.1	J (29-14)	J	J	J	J	J	N	N	N	N
A106_JQ245971.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
A106_JX025555.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N

B3_DQ473485.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B3_EF173422.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B4_DQ473490.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B4_JN798573.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B5_FJ445112.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B6_DQ473486.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B6_JN562723.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B6_JQ747745.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B6_JQ747748.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B6_JX193795.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B14_L05355.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B14_K02121.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B14_X01087.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N

<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
B17_EF173420.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B26_FJ445124.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B27_EF173421.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B27_FJ445186.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B35_DQ473487.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B35_FJ445187.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B37_EF173423.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B42_FJ445130.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B42_JN562724.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B42_JF781498.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B42_JF781507.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B48_DQ473488.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B48_JN990698.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B52_EF173424.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B52_FJ445188.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B69_FJ445151.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B69_HQ123445.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
B69_JN562721.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B69_JQ245970.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B70_DQ473489.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B70_JQ245974.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B72_FJ445153.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B72_GU968948.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
B72_JN562726.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B72_JN614997.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B72_JN798562.2	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B72_JQ245969.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B79_FJ445155.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B83_FJ445161.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B83_JN990701.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_FJ445162.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JF781499.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JF781502.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JN541271.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JN614991.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JQ837723.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B84_JX074048.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B86_FJ445164.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B91_FJ445168.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N

<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
B92_FJ445169.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B93_EF173425.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B97_FJ445172.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B99_FJ445174.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B100_HQ123444.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
B101_JF781500.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B101_JF781501.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B101_JX074052.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B102_JX074053.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B103_JN614996.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B103_JN798572.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B103_JQ245972.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B103_JQ837717.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B103_JQ994497.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B104_FJ445137.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
B104_JF781506.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N

C1_EF077279.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
C1_HQ123443.2	?	?	?	?	?	?	J (16-32)	N	N	N
C2_EF077280.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C2_JN815248.1	?	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C2_JN837695.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C2_JN990703.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C2_JQ245968.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C2_JX025557.1	?	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C3_EF186077.2	J (16-15)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
C3_JN798567.1	J (16-15)	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
C3_JN990700.1	?	J	J	J	N	N	J (16-32)	N	N	N
C4_EF582385.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C4_JF781509.1	?	?	?	?	N	N	N	N	N	N
C5_EF582386.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C6_EF582387.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C6_JF317016.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C6_JN990702.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C7_DQ875932.2	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C7_JN798559.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N

<b>Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer</b>	<b>Du1B-12 Du16-15 Du29-14</b>	<b>Du16/29-02</b>	<b>Dua-01</b>	<b>Dua-02</b>	<b>Dua-03</b>	<b>Dua-04</b>	<b>Du1B-24 Du16-32 Du29-29</b>	<b>Du1B-25 Du16-33 Du29-30</b>	<b>Du1B-28</b>	<b>Du16-37</b>
C7_JN798570.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C7_JN837689.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C7_JX025556.1	?	?	J	J	N	N	N	N	N	N
C8_GQ223227.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C8_JQ245964.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C8_JQ245973.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C9_GQ223228.1	N	J	J	J	N	N	N	N	N	N
C10_GQ323774.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C11_EU840952.2	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C12_JF317017.1	J (29-14)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C15_GU219984.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C15_JF317014.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C15_JN837688.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C17_JN815240.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C17_JN815244.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C22_JN621242.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C25_HQ123440.1	?	?	?	?	?	?	N	N	N	N
C25_JF317013.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C25_JN837685.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C26_JX193796.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C28_JN798569.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C32_JN798581.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C32_JQ994498.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C34_JF436926.1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
C35_JF436925.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C36_JN541267.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C38_JN837691.1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
C39_JN205461.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C40_JF781505.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C40_JN815251.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C41_JN798565.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C42_JQ994500.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C43_JN837687.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C43_JX074056.1	J (16-15)	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C45_JN837686.1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
C49_JF907574.1	?	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C51_JF317015.1	N	N	J	J	N	N	N	N	N	N
C51_JX291115.1	J (1B-12)	N	J	J	N	N	N	N	N	N

Virustyp (HRV-) Genbank Zugangsnummer	Du1B-12 Du16-15 Du29-14	Du16/29-02	Dua-01	Dua-02	Dua-03	Dua-04	Du1B-24 Du16-32 Du29-29	Du1B-25 Du16-33 Du29-30	Du1B-28	Du16-37
--	-------------------------------	------------	--------	--------	--------	--------	-------------------------------	-------------------------------	---------	---------

Die Tabelle enthält alle Virustypisolate sowie alle DNAzyme, die in der Screening-Untersuchung katalytische Aktivität gezeigt haben. „N“ markiert alle Virustypisolate, deren Genom die DNAzym-Zielsequenz nicht enthält. „J“ markiert alle Virustypisolate, deren Genom die DNAzym-Zielsequenz enthält. Bei Schnittstellen mit mehreren DNAzymen ist in Klammern zusätzlich angegeben, welches der DNAzyme eine Zielsequenz auf dem entsprechenden Virusgenom besitzt (Bsp.: Du1B-12 besitzt eine Zielsequenz auf HRV-A1\_D00239.1). „?“ markiert alle Virustypisolate, deren Genomsequenz im Bereich der DNAzym-Zielsequenz nicht ausreichend sequenziert ist.

**Tab. 23 Auflistung der Virustypisolate mit Zielsequenzen für die aktiven DNAzyme in der CRE Region (aus der Screening-Untersuchung)**

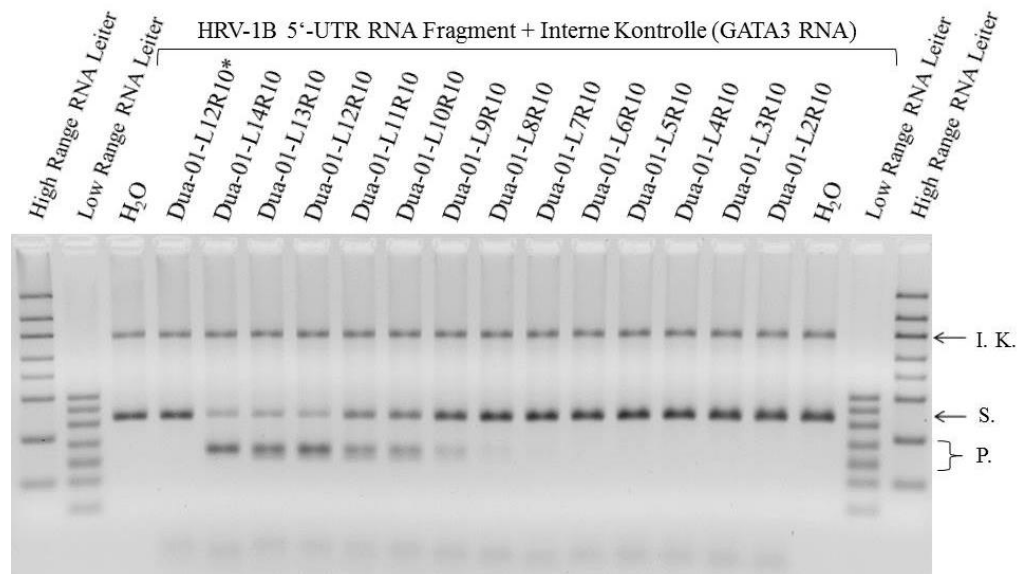
Schnittstelle	DNAzym	Virustypisolate (HRV-) mit DNAzym-Zielsequenz
1	Dc1B-01	A1_D00239.1
2	Dc29-01	A29_FJ445125.1
3	Dc29-02	A29_FJ445125.1
4	Dc1B-06	A1_JN815255.1; A8_FJ445113.1; A8_FJ445170.1; A66_JN112340.1; A66_JN621246.1; A66_JQ837715.1
	Dc29-03	A29_FJ445125.1
5	Dc16-09	A16_L24917.1; A16_JN798564.1; A16_JN990704.1; A16_JX074057.1
6	Dc16-10	A16_L24917.1; A16_JN798564.1; A16_JN990704.1; A16_JX074057.1
7	Dc29-04	A29_FJ445125.1
8	Dc16-12	A16_L24917.1; A16_JN990704.1; A16_JX074057.1
	Dc29-05	A29_FJ445125.1
9	Dc16-13	A16_L24917.1
10	Dc1B-12	A1_D00239.1
11	Dc1B-13	A1_D00239.1
12	Dc29-08	A29_FJ445125.1
13	Dc29-09	A29_FJ445125.1
14	Dc1B-15	A1_D00239.1
15	Dc29-13	A29_FJ445125.1
16	Dc29-19	A29_FJ445125.1; A33_FJ445128.1; A33_JN815250.1; A33_JN990707.1; A38_DQ473495.1; A38_FJ445180.1; A38_JQ994496.1
17	Dc16-26	A16_L24917.1
18	Dc16-27	A16_L24917.1
19	Dc16-31	A9_FJ445114.1; A9_FJ445115.1; A16_L24917.1; A24_JN798563.1; A55_DQ473511.1; A55_JQ837718.1
20	Dc1B-31	A1_D00239.1; A1_FJ445111.1; A19_JQ747746.1; A19_JQ747750.1; A57_FJ445141.1
	Dc16-32	A16_L24917.1; A24_JN798563.1; A29_DQ473499.1; A34_JN562720.1; A47_FJ445133.1; A50_FJ445135.1; A54_FJ445139.1; A55_DQ473511.1; A77_FJ445154.1
	Dc29-28	A29_FJ445125.1; A34_DQ473501.1; A34_FJ445189.1; A40_FJ445129.1; A40_JN798579.1; A40_JQ245967.1; A40_JX074051.1; A54_FJ445138.1; A62_FJ445145.1; A90_FJ445167.1



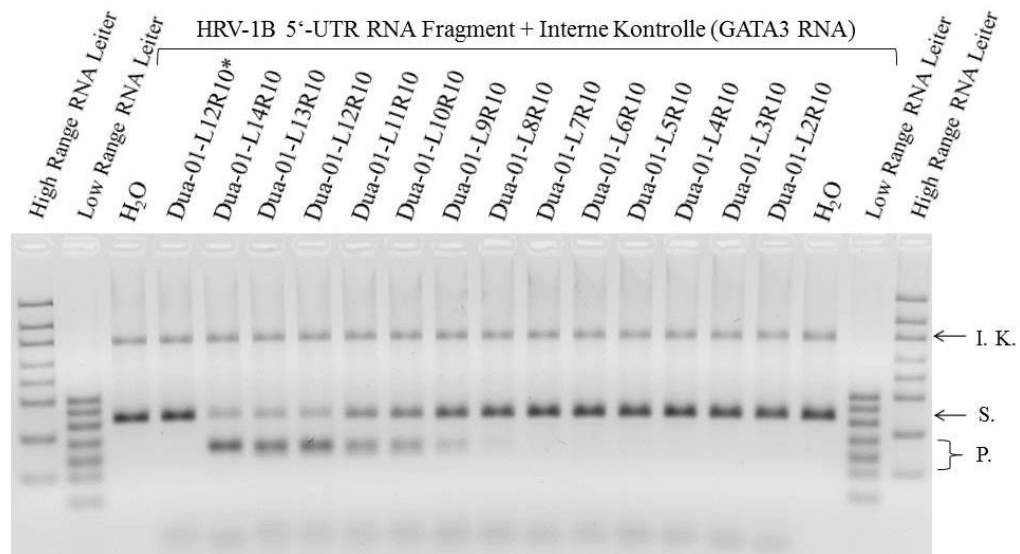
Schnittstelle	DNAzym	Virustypisolate (HRV-) mit DNAzym-Zielsequenz
21	Dc1B-32	A1_D00239.1; A1_FJ445111.1; A1_JN815255.1; A9_FJ445177.1; A19_FJ445119.1; A19_JQ747746.1; A19_JQ747750.1; A33_FJ445128.1; A33_JN815250.1; A33_JN990707.1; A38_JQ994496.1; A39_AY751783.1; A57_FJ445141.1; A60_FJ445143.1; A75_JF781503.1; A75_JN837690.1; A96_FJ445171.1
	Dc16/29-01	A15_JN541268.1; A16_L24917.1; A16_JN562722.1; A16_JN614992.1; A16_JN798564.1; A16_JN798574.1; A16_JN815253.1; A16_JN990704.1; A16_JX074057.1; A18_FJ445118.1; A18_JF781496.1; A18_JF781508.1; A20_JN541270.1; A23_JN621244.1; A23_JN815254.1; A23_JN837696.1; A24_EF173416.1; A24_FJ445190.1; A24_JN798563.1; A28_DQ473508.1; A28_JN798580.1; A28_JQ747751.1; A29_FJ445125.1; A34_DQ473501.1; A34_FJ445189.1; A34_JN562720.1; A36_DQ473505.1; A36_JF781497.1; A40_FJ445129.1; A40_JN798579.1; A40_JQ245967.1; A40_JX074051.1; A43_FJ445131.1; A43_JN815237.1; A49_DQ473496.1; A49_FJ445134.1; A49_JN621241.1; A49_JN798561.1; A49_JN798589.1; A50_FJ445135.1; A51_JN562725.1; A61_FJ445144.1; A68_FJ445150.1; A68_JN798578.1; A71_FJ445152.1; A77_FJ445154.1; A80_FJ445156.1; A103_JQ994499.1; A104_JN562727.1; A104_JX074047.1; A104_JX193797.1; C15_JN837688.1
22	Dc1B-33	A1_D00239.1; A1_JN815255.1; C9_GQ223228.1
	Dc16-34	A16_L24917.1; A16_JN562722.1; A16_JN614992.1; A16_JN798564.1; A16_JN798574.1; A16_JN815253.1; A16_JN990704.1; A16_JX074057.1; A34_JN562720.1; A49_DQ473496.1; A49_FJ445134.1; A49_JN621241.1; A49_JN798561.1; A49_JN798589.1; A68_FJ445150.1; A68_JN798578.1; A81_FJ445157.1; A81_FJ445158.1; A81_FJ445159.1; A81_HQ123442.1; C8_JQ245964.1; C8_JQ245973.1
	Dc29-30	A28_JN798580.1; A29_FJ445125.1; A45_FJ445132.1; A66_FJ445148.1
23	Dc1B-34	A1_D00239.1; A1_JN815255.1; A16_JN798564.1; A16_JN990704.1; A34_JN562720.1; A61_JN798560.1; A68_FJ445150.1; A68_JN798578.1; C9_GQ223228.1
24	Dc1B-37	A1_D00239.1
25	Dc1B-38	A1_D00239.1
	Dc16-38	A16_L24917.1; A82_DQ473509.1; A82_FJ445160.1
26	Dc1B-39	A1_D00239.1; A1_JN815255.1
	Dc16-39	A16_L24917.1
27	Dc16-40	A16_L24917.1; C36_JN541267.1

## 12.1.2 Spaltungsprüfungen von quantitativen Analysen

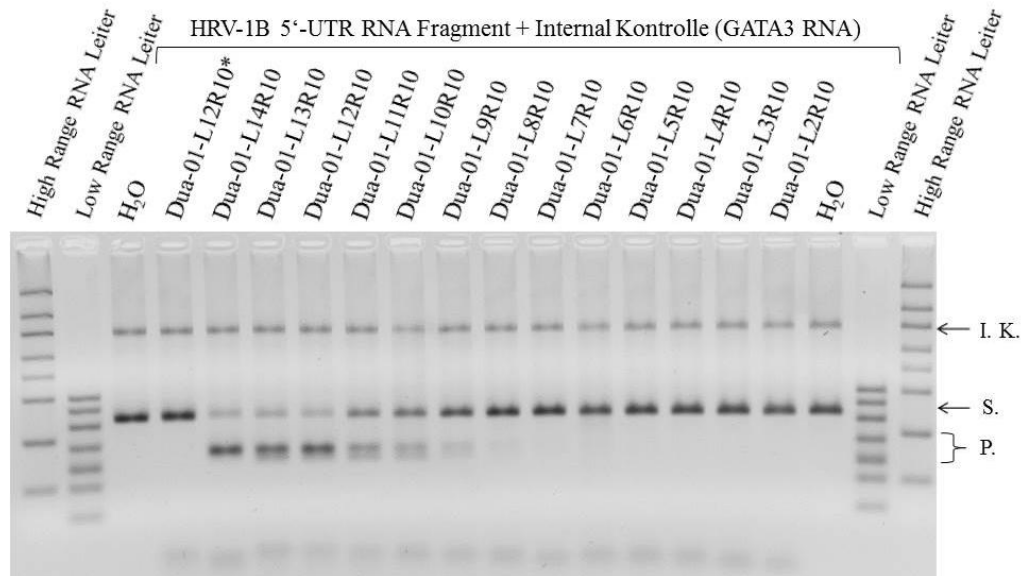
### 12.1.2.1 Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 3



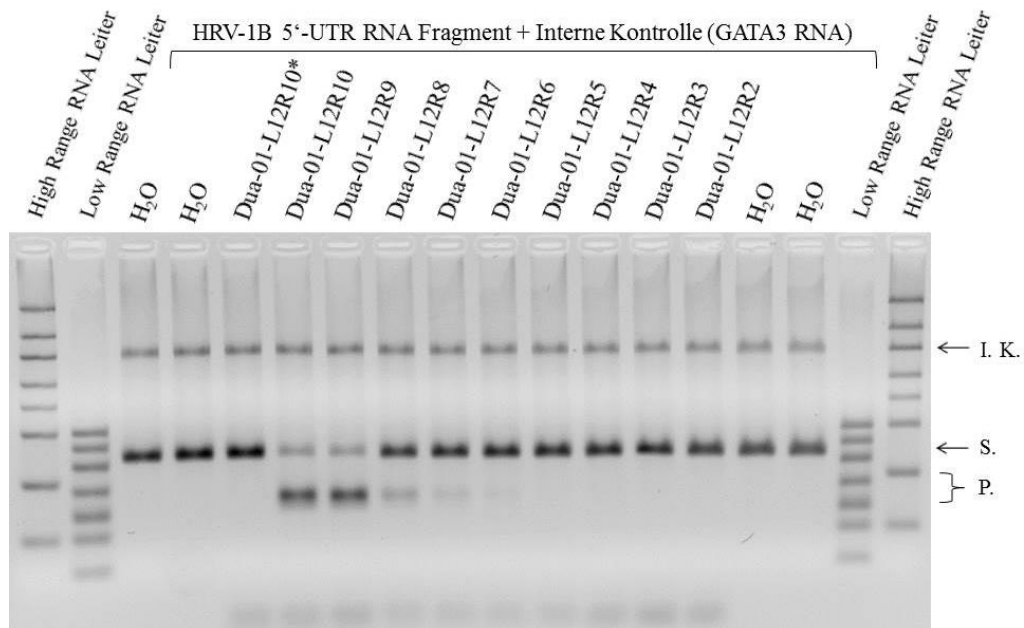
**Abb. 53** Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



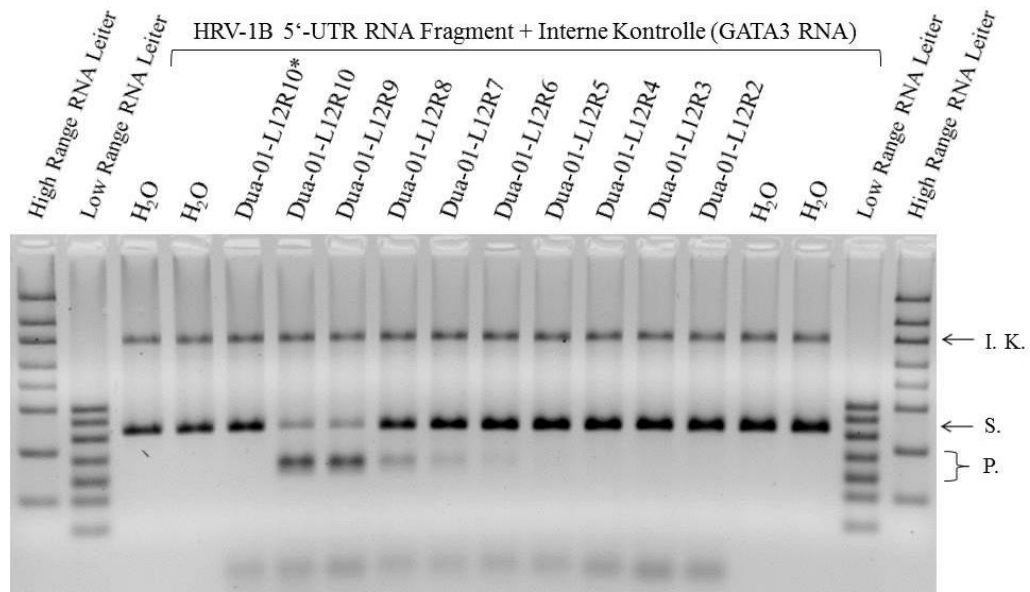
**Abb. 54** Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



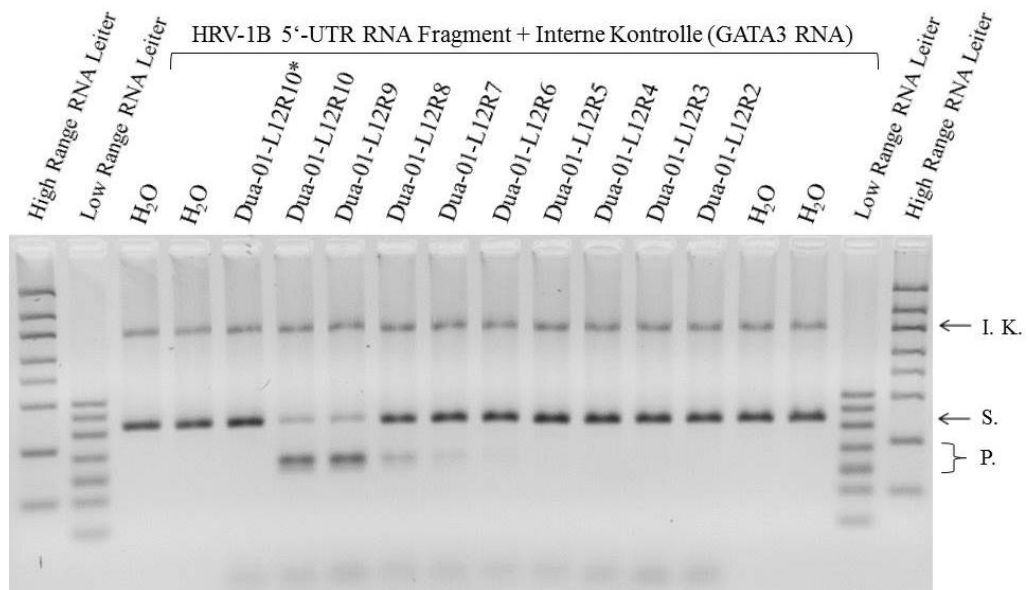
**Abb. 55** Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



**Abb. 56** Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

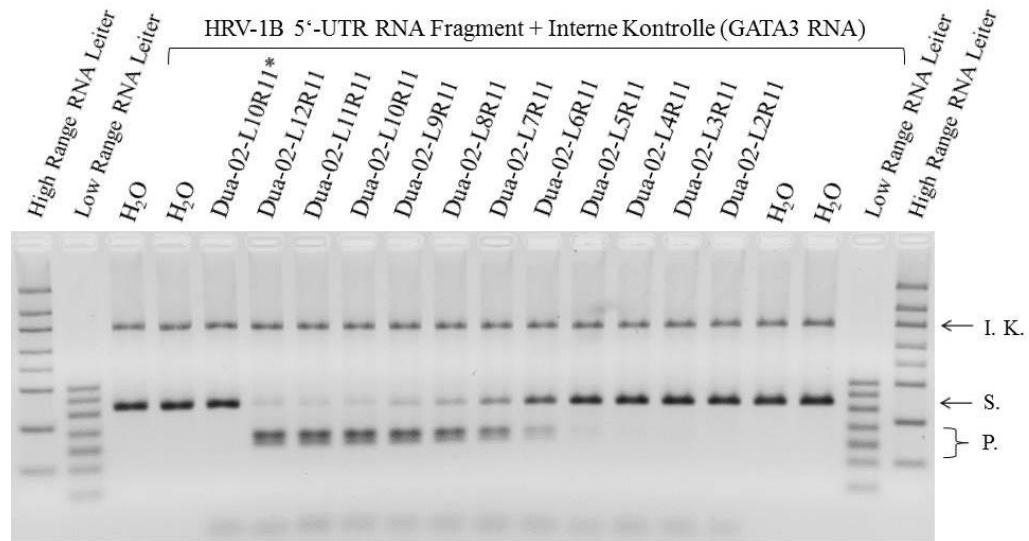


**Abb. 57** Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

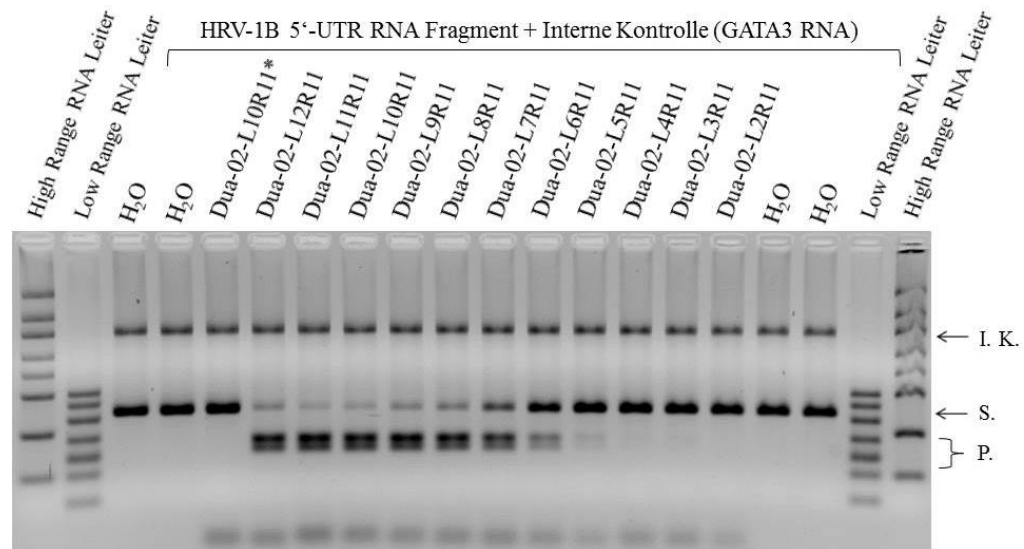


**Abb. 58** Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-01 an Schnittstelle 3; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

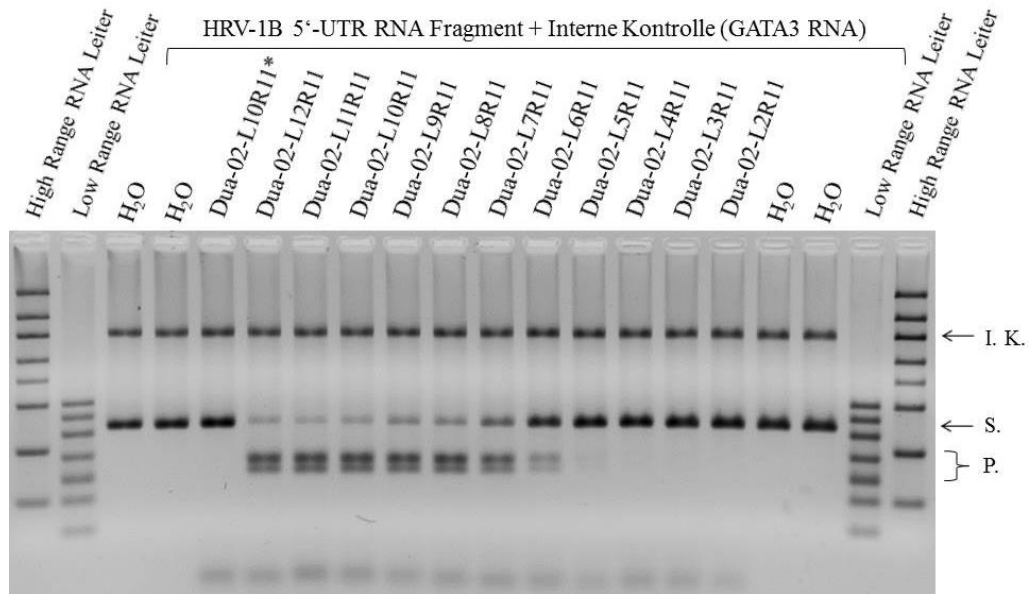
### 12.1.2.2 Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 4



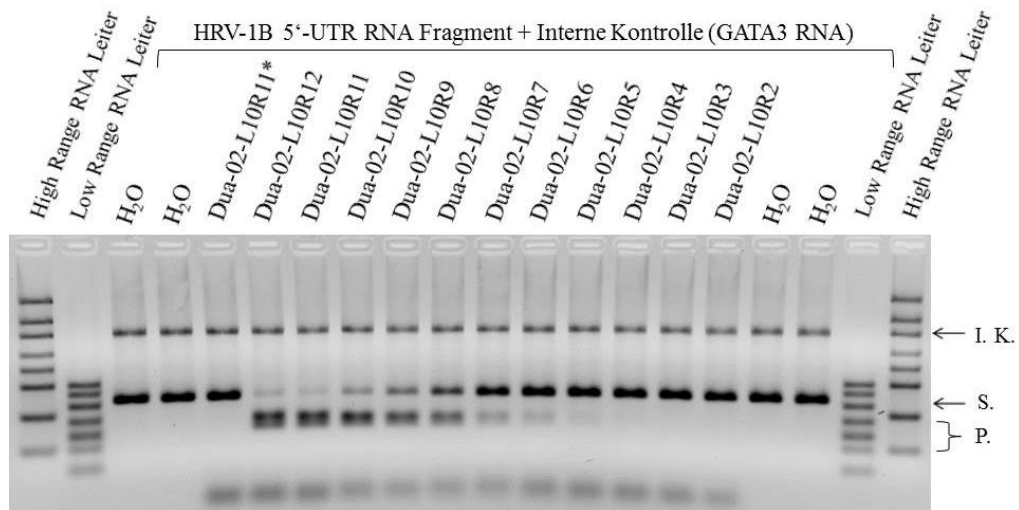
**Abb. 59** Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



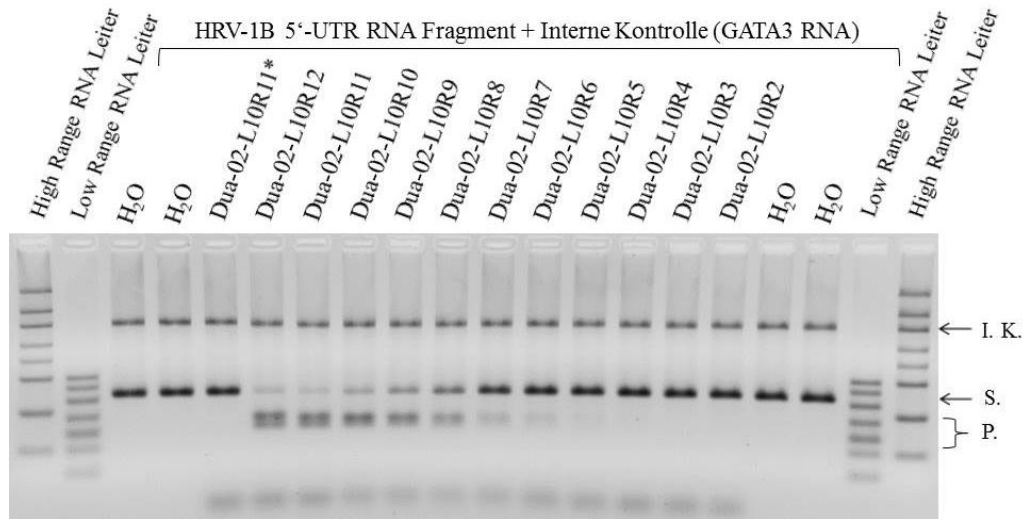
**Abb. 60** Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



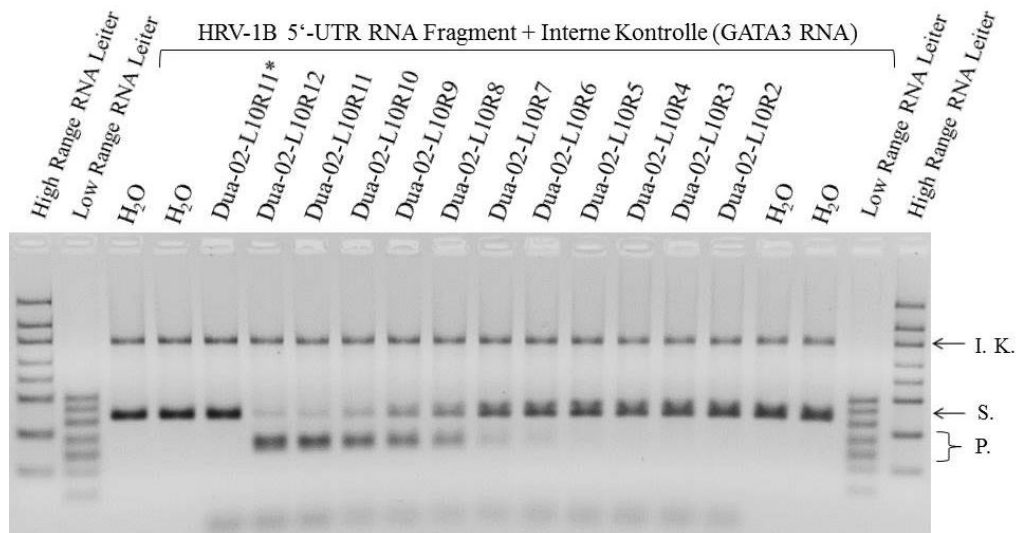
**Abb. 61** Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



**Abb. 62** Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

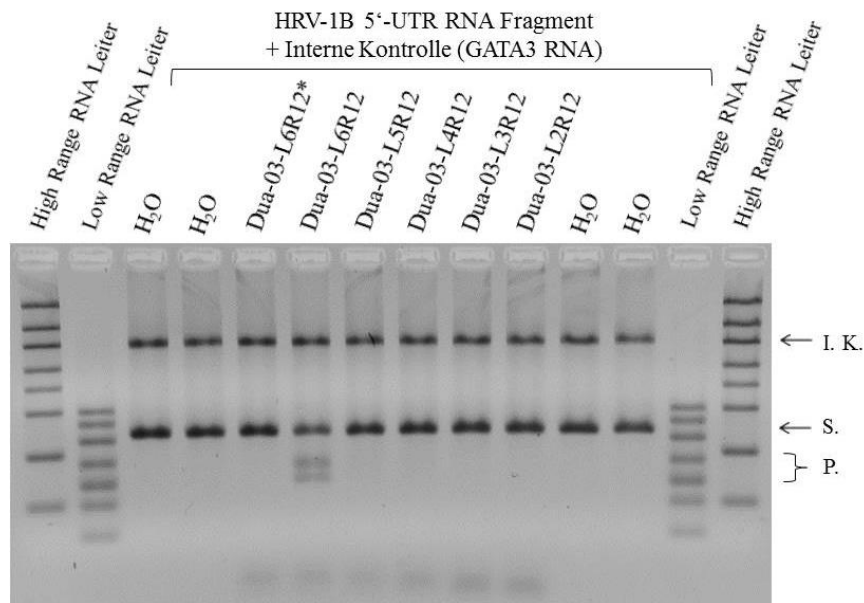


**Abb. 63** Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

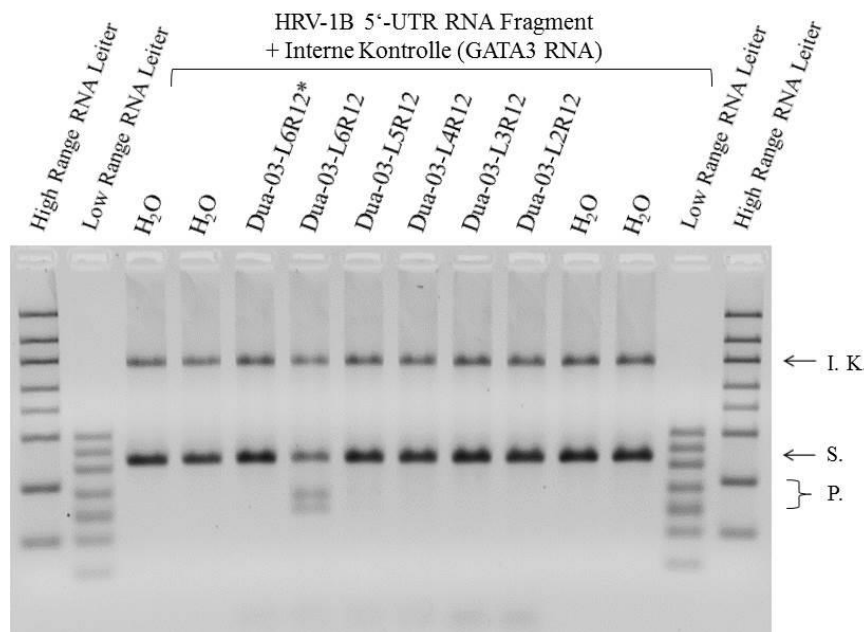


**Abb. 64** Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-02 an Schnittstelle 4; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

### 12.1.2.3 Quantitative Testung der Längenvarianten an Schnittstelle 5

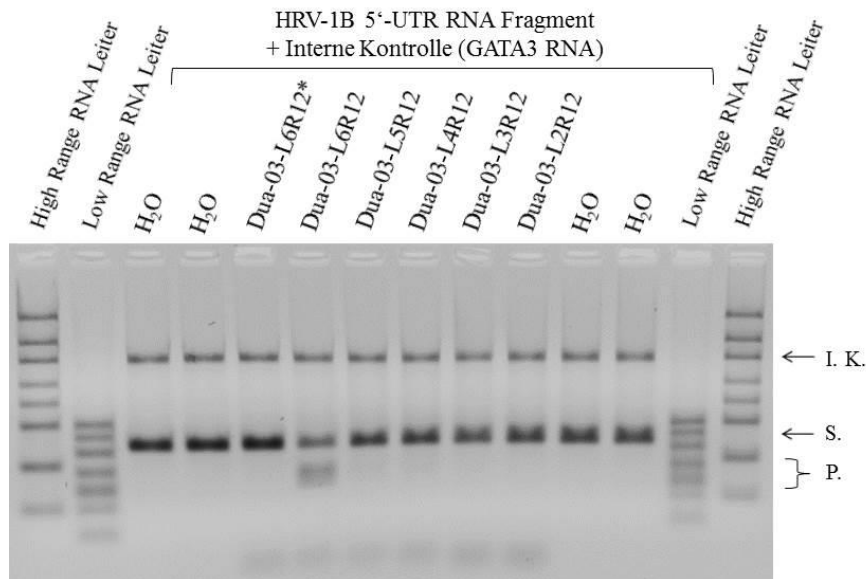


**Abb. 65** Testung 1 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

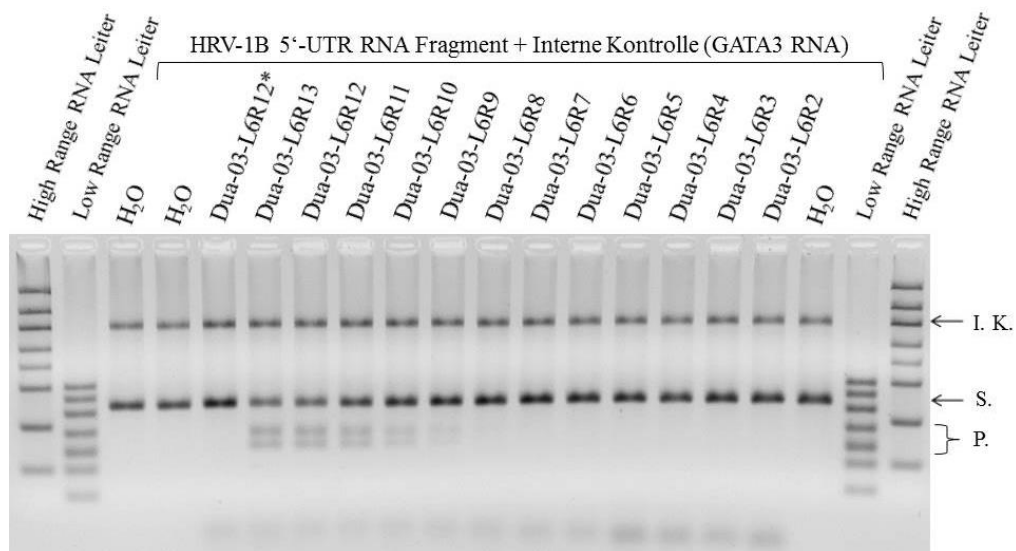


**Abb. 66** Testung 2 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

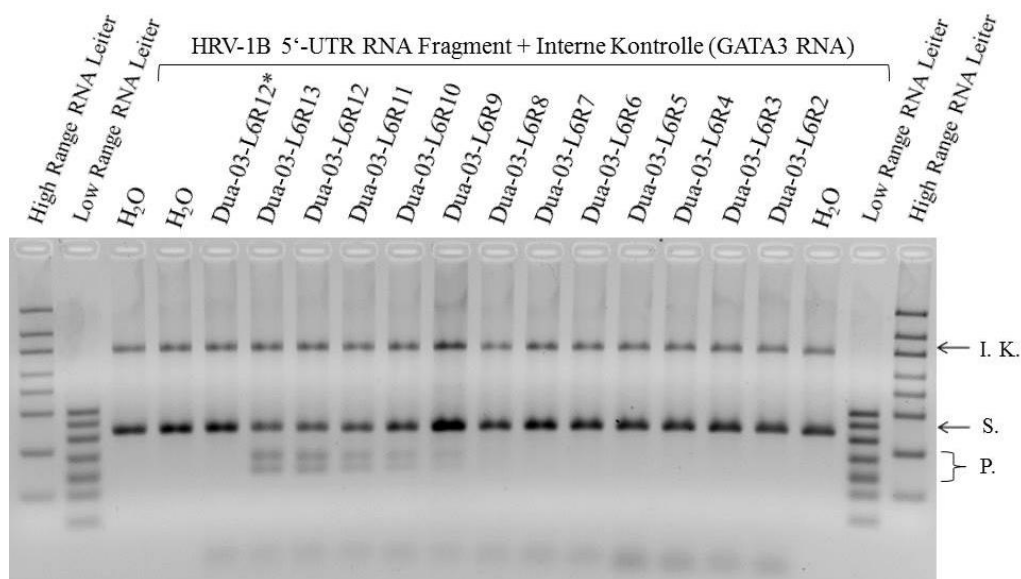




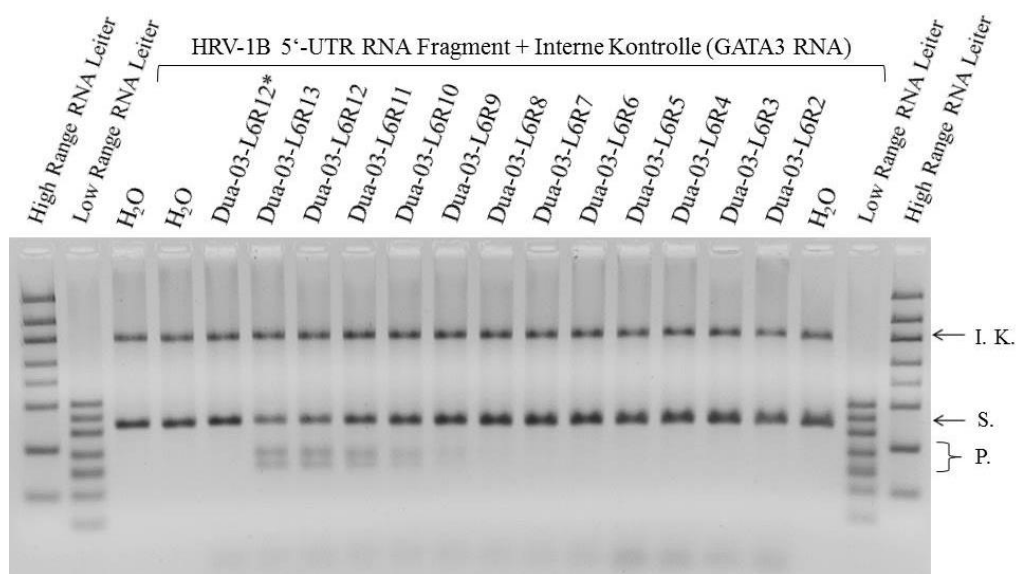
**Abb. 67** Testung 3 von Längenvarianten der linken Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



**Abb. 68** Testung 1 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

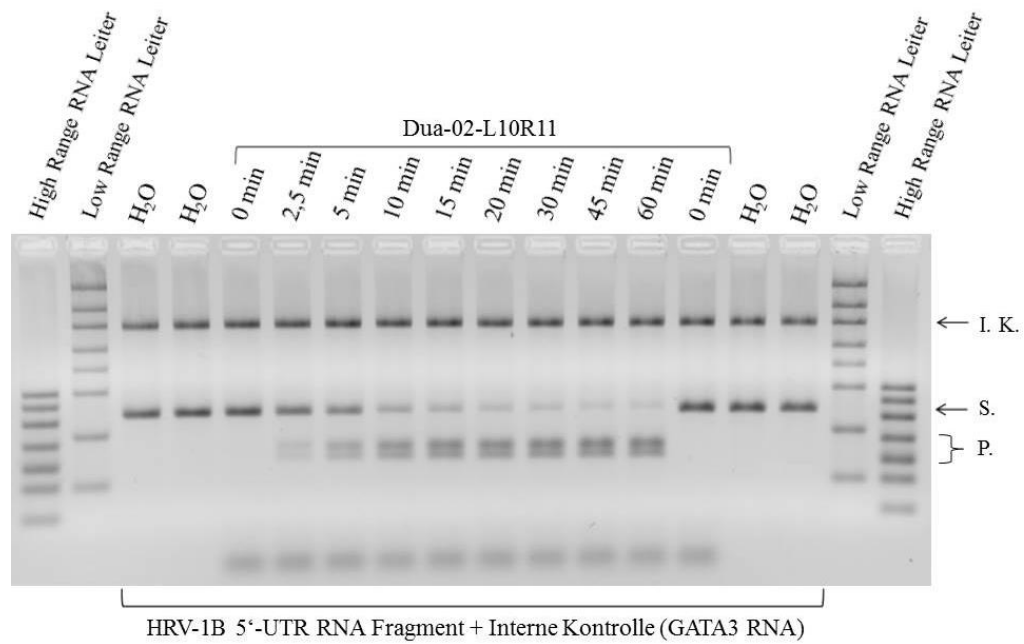


**Abb. 69** Testung 2 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

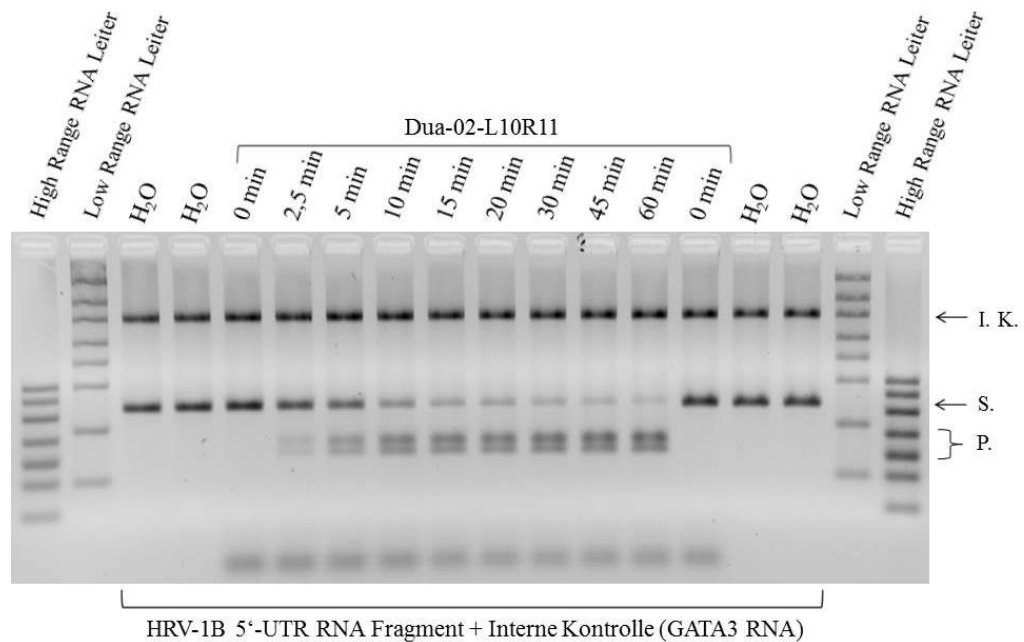


**Abb. 70** Testung 3 von Längenvarianten der rechten Bindungsdomäne von Dua-03 an Schnittstelle 5; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 20 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; \*: ohne Inkubation, I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

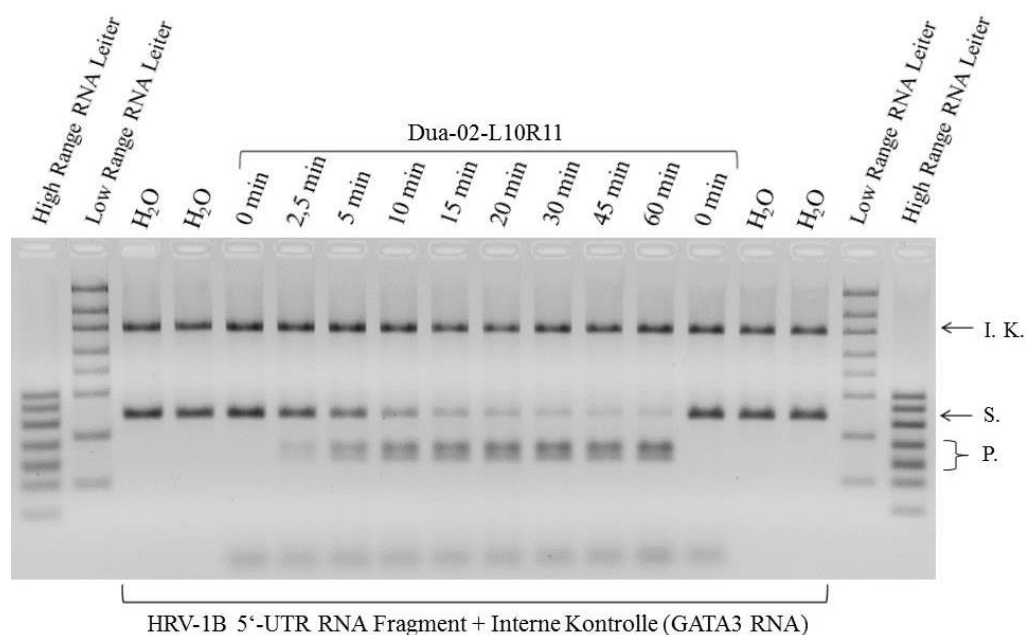
### 12.1.2.4 Abhängigkeit von der Inkubationszeit



**Abb. 71** Testung 1 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 7,5 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



**Abb. 72** Testung 2 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 7,5 pmol DNazym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte



**Abb. 73** Testung 3 der Spaltungsaktivität von Dua-02-L10R11 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit; 150 ng Virus-RNA, 125 ng GATA3-RNA und 7,5 pmol DNAzym pro Probe auf 2,5% TAE-Agarosegel; I.K.: Interne Kontrolle, S.: Substrat, P.: Produkte

### 12.1.3 Aussagekraft der quantitativen Ergebnisse

In der quantitativen Testung von Längenvarianten der Bindungsdomänen fällt auf, dass einige Proben zu Messergebnissen von über 100 Prozent verbliebener Substratmenge führten. Die Präparation der Negativ-Kontrolle zur Ermittlung des Referenzwerts von 100 Prozent Substratmenge erfolgte unter Zugabe eines hochwirksamen DNAzyms unter permanenter Eiskühlung und ohne Durchführung des Inkubationsschrittes. Dabei wurde sich bewusst für eine Zugabe von DNAzym entschieden, um ein unterschiedliches Trenn- und Detektionsverhalten zwischen den Proben und der Negativ-Kontrolle durch mögliche nicht-enzymatische Interaktionen von Substrat und DNAzym auszuschließen. Möglicherweise erfolgte in dieser kurzen Zeit der Präparation bereits eine geringfügige Spaltung des Substrats, während Proben mit unwirksamen DNAzymen auch bei Inkubation keinen Substratabbau erfuhren. Eine objektive Beurteilung des unterschiedlichen Ausmaßes und der Größenordnung der Spaltungsaktivität der aktiven DNAzyme wird dadurch jedoch nicht beeinträchtigt.

## 12.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

- In Augsburg die Damen und Herren: Aulmann, Berghaus, Er, Gölder, Hackanson, Hirschbühl, Kopp, Märkl, Messmann, Pusch, Rank, Schaller, von Scheidt, Schmid, Trepel, Wahle, Wehler
- In Marburg die Damen und Herren: Adamkiewicz, Aepinus, Alter, Arabin, Aust, Awe, Baarlink, Bacher, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Behe, Bein, Belting, Bender, Benes, Benöhr, Bepler, Berger, Bergmann, Bertelmann, Berwanger, Best, Betourne, Bette, Beyer, Bien, Bliemel, Blüml, Bock, Böhm, Bolm, Bölöni, Bonaterra, Bösner, Bouchard, Bozlurt, Brandt, Braun, Brehm, Brilla, Brumberg, Bücking, Bujan, Burchert, Burghard, Carl, Cetin, Christ, Conrad, Cordes, Czubayko, Dannowski, Daut, Decher, del Rey, Dettmeyer, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Dornow, Duda, Eberhart, Efe, Eggers, Eickmann, Eivazi, El Tobgui, Ellenrieder, El-Zayat, Eming, Engenhardt-Cabillic, Enzensberger, Ermisch, Falkenberg, Faoro, Feldmann, Fendrich, Fenner, Feuser, Frankenberger, Franz, Freund, Frink, Fritz, Frohme, Fuchs-Winkelmann, Funk, Gaiser, Gallmeier, Garn, Gebhardt, Gehling, Geks, Geldner, Geraedts, Gerken, Glatz, Glatzl, Göbel, Göke, Goldmann, Görg, Götze, Graf, Gratz, Gress, Greulich, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grundmann, Haberhausen, Habermann, Hadji, Halaszovich, Hasenacker, Häußermann, Hegele, Heidtmann, Heinis, Hemmeter, Henke, Henzel, Hertl, Heverhagen, Hewel-Hildebrand, Heyd, Heyse, Hildebrandt, Hirdes, Hirsch, Hofer, Höffkes, Hofmann, Holland, Holst, Hörsch, Hoss, Hoyer, Hudemann, Hundt, Iqrsusi, Jackisch, Jacobson, Jaques, Jerrentrup, Josephs, Jung, Kaiser, Kalder, Kalinowski, Kamp-Becker, Kampmann, Kann, Kanngießer, Karatolios, Katebini, Kaufmann, Keller, Kern, Kerwat, Kesper, Kill, Kim-Berger, Kinscherf, Kircher, Kirn, Kirschbaum, Klaus Klose, Kluge, Knake, Knipper, Knöppel, Koczulla, Kohl, Köhler, Kolb-Niemann, König, Kortus, Kösters, Kratz, Krautheim, Kreutzer, Kroh, Kruse, Kubo, Kuhlmann, Kühne, Kühnert, Kunsch, Kurt, Lankat-Buttgereit, Laudenbach, Lauer, Lauth, Leonhardt, Librizzi, Lill, Lindstedt, Loest, Lohoff, Lübke, Lübke, Lüsebrink, Luster, Mahnken, Maier, Maisch, Maisner, Mand, Manthey, Maurer, Mehl, Meissner, Menzler, Merte, Metzelder, Meyer, Michl, Mingbach, Moll, Möller, Moosdorf, Morin, Mronga, Mueller, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Mylius, Nain, Neff, Neubauer, Neubert, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Nockher, Noll, Oberthür, Oberwinkler, Oertel, Öhler,

- Ohlow, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankow, Pankuweit, Pantazis, Pape-Meyer, Parahuleva, Patrascan, Pehl, Peterlein, Pfefferle, Pfeiffer, Pfützner, Pinkenburg, Plant, Plöger, Politi, Potaczek, Pöttgen, Preisig-Müller, Pressel, Printz, Puccetti, Quascher, Quint, Ramaswamy, Rastan, Rath, Reese, Reiter, Renz, Repenning, Richter, Rick, Riera Knorrenschild, Ries, Rodepeter, Roeßler, Rogosch, Röskam, Rost, Roth, Röttgers, Ruchholtz, Schäfer, Schales, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schnare, Schneider, Schneyer, Schoner, Schratt, Schröder, Schrott, Schu, Schulze, Schüttler, Schütz, Schwabe, Schwarz, Schwind, Seifart, Seipelt, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Shams-Eldin, Shir, Sohlbach, Sölter, Sommer, Stahl, Steinbach-Hund, Steinfeldt, Steinhoff, Steiniger, Steinkamp, Steinmetzer, Stibane, Stiewe, Strassmann, Strik, Strutz, Stuck, Suske, Tackenberg, Tebbe, Teepker, Teymoortash, Theisen, Thiede, Thiemann, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Torossian, Träger, Ulrich, Vassiliou, Viniol, Visciani, Vogelmeier, Vogt, Völlger, von Bierbrauer, von Zezschwitz, Vorwerk, Wack, Wagner, Wallot, Wanzel, Weber, Weihe, Werdecker, Werlein, Werner, Westerman, Westermann, Westhoff, Wicker, Wiegand, Wilhelm, Winzenburg, Wissniowski, Wittig, Wolf, Wollmer, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Yang, Yu, Zavorotny, Zemlin, Zentgraf, Ziemek, Ziller, Zink, Ziring, Zoremba, Zovko, Zugmaier, Zwioerek
- In Newcastle upon Tyne die Damen und Herren: Brodlie, McKean, Moss, O'Brien, Thomas
  - In Panama die Damen und Herren: Garcia Mayorca, Latorraca, Liao, Mon, Quiodettis, Valderrama

## 12.3 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all jenen Menschen, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Harald Renz danke ich für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe und Unterstützung in der Realisierung des Projekts.

Vielen Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, stete Hilfsbereitschaft und die professionellen Ratschläge.

Danke an Dr. Daniel Potaczek und Dr. Christoph Hudemann für die Bereitstellung der Virus-Plasmide.

Professor Holger Garn danke ich für die Unterstützung und stets konstruktive Kritik in allen Fragen.

Außerordentlicher Dank gilt meinem Betreuer Dr. Daniel Potaczek für die intensive Betreuung und Anleitung, insbesondere jedoch die ansteckende Forschungsbegeisterung und die unzähligen Diskussionen. „We did manage...“

Danke an Toni, Lukas, Verena und Maite für die gemeinsamen Schreibstunden und gegenseitige Aufmunterung. Danke an meine Schwestern Amelie und Kathrin für die aufbauenden Worte in Zeiten des Zweifels und die Lektüre des Manuskripts.

Zum Schluss gilt mein Dank Julia und meinen Eltern Sylke und Rudolf Unger für ihre moralische Unterstützung und Geduld, ohne die die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank!